

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Северный (Арктический) федеральный университет  
имени М.В. Ломоносова»

*На правах рукописи*



СЫПАЛОВ СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УМИФЕНОВИРА, АМБРОКСОЛА, БРОМГЕКСИНА  
И ПРОДУКТОВ ИХ ТРАНСФОРМАЦИИ В ОБЪЕКТАХ  
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МЕТОДАМИ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-  
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

1.4.2. – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

Кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
Ульяновский Н.В.

Архангельск

2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР .....	9
1.1 Дезинфекция сточных вод.....	9
1.2 Побочные продукты дезинфекции .....	10
1.3 Фармацевтические препараты .....	11
1.4 Умифеновир, амброксол и бромгексин .....	14
1.5 Методы определения фармацевтических препаратов, их метаболитов и побочных продуктов дезинфекции.....	17
1.6 ВЭЖХ-ИСП-МС.....	25
1.7 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования .	28
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	30
2.1 Оборудование .....	30
2.2 Реактивы и материалы .....	31
2.3 Объекты исследования .....	33
2.4 Модельное окисление и хлорирование .....	34
2.5 Идентификация промежуточных продуктов трансформации .....	36
2.6 Идентификация продуктов глубокой трансформации .....	37
2.7 Количественное определение побочных продуктов дезинфекции .....	38
2.8 Количественное определение бромид-аниона .....	39
2.9 Экстракция амброксола, бромгексина и умифеновира .....	39
2.9.1 Предварительная оценка содержания аналитов.....	39
2.9.2 Твердофазная экстракция .....	40
2.9.3 Жидкостная экстракция под давлением .....	40
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	42
3.1 Изучение трансформации умифеновира.....	42

3.2 Изучение трансформации амброксола и бромгексина .....	55
3.3 Оценка содержания умифеновира, амброксола, бромгексина и побочных продуктов их дезинфекции в объектах окружающей среды .....	69
3.4 Разработка методики определения умифеновира и его метаболитов...	71
ВЫВОДЫ .....	86
ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ .....	88
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	90

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Сточные воды отводимые от населенных пунктов через систему канализации, в значительной степени загрязнены не только органическими соединениями, но и патогенными организмами. Согласно СанПин 2.1.5.980–00 [1], сбрасывать их в природные водные объекты не допускается без соответствующей очистки и обеззараживания. В этом аспекте значительными преимуществами обладают технологии, основанные на применении хлорсодержащих реагентов. Несмотря на доступность и высокую эффективность подавления патогенов, такие способы имеют ряд недостатков, ключевым из которых является образование побочных продуктов дезинфекции (ППД) в результате взаимодействия растворенного органического вещества с активным хлором.

Большое внимание специалистов привлекают новые (эмерджентные) загрязнители - потенциальные прекурсоры ППД, присутствующие в сточных водах, важной особенностью которых является способность образовывать с активным хлором более токсичные и опасные для окружающей среды соединения. Одними из источников такого рода органических загрязнителей выступают фармацевтические препараты, потребление которых напрямую зависит от эпидемиологической ситуации и сезонных заболеваний. В период пандемии COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, наибольшее распространение получили антибиотики, противовирусные препараты, противокашлевые и муколитические средства. На территории Российской Федерации и в ряде других стран многократно увеличилось потребление таких препаратов, как умифеновир, амброксол и бромгексин. Наличие как минимум одного атома брома в их структурах может способствовать образованию бромсодержащих побочных продуктов дезинфекции, которые зачастую более токсичны относительно их хлорсодержащих аналогов. Но сведения об этих соединениях, путях трансформации, контроле их содержаний в ходе водного хлорирования практически отсутствуют.

Поиск, идентификация и определение фармацевтических препаратов, их метаболитов, побочных продуктов дезинфекции в сточных водах в основном проводится методами жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии. Имеющиеся подходы существенно ограничены при количественном анализе из-за отсутствия коммерчески доступных стандартных образцов, в первую очередь, для определения метаболитов и ППД. При этом для оценки реального уровня загрязнения и потенциального воздействия на окружающую среду необходим контроль максимально широкого круга образующихся загрязнителей, наряду с исходными прекурсорами. В этом аспекте актуальной является задача по разработке новых способов и подходов к определению бромсодержащих фармацевтических препаратов и метаболитов их в сточных водах. Наличие атома галогена в структурах умифеновира, амброксола и бромгексина представляет возможность решения проблемы нестандартного определения их масс-спектрометрическим детектированием с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС), имеющей высокую чувствительность по бромю. Задача контроля бромсодержащих компонентов в сточных водах может решаться сочетанием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием ИСП-МС (количественный анализ) и масс-спектрометрией высокого разрешения (МСВР, идентификация).

**Цель работы.** Разработка новых подходов для определения бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Обоснование и реализация условий детектирования бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием;

2. Изучение трансформации умифеновира, бромгексина, амброксола в условиях водного хлорирования, идентификация основных образующихся побочных продуктов дезинфекции и мониторинг их содержания в объектах окружающей среды;

3. Разработка методики определения умифеновира и его метаболитов в природной и сточной водах, активном иле и донных отложениях;

4. Апробация разработанной методики определения умифеновира и его метаболитов в реальных образцах методами ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС.

**Научная новизна диссертационного исследования.** Предложен научно-методический подход по определению бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды с использованием единого аналитического стандарта с пределами обнаружения (в пересчете на бром) на уровне концентраций 0,2 нг/л для жидких образцов и 2 мкг/кг – твердых.

Получены новые знания о трансформации умифеновира, амброксола и бромгексина в условиях водного хлорирования, идентифицированы продукты их превращений.

**Практическая значимость.** На примере городской агломерации (Архангельск-Новодвинск-Северодвинск) субарктической территории РФ проведена апробация предложенных подходов для оценки уровня негативного воздействия бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации. Результаты исследования могут найти применение для определения амброксола, бромгексина, умифеновира и продуктов их трансформации в технологических процессах очистных сооружений канализации города.

Впервые проведена оценка содержания умифеновира, амброксола, бромгексина и побочных продуктов их трансформации в реальных объектах сточных вод и окружающей среды.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Новый подход к поиску, идентификации и определению бромсодержащих фармацевтических препаратов, а также продуктов их трансформации в сточных водах и объектах окружающей среды методом ВЭЖХ с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием ИСП-МС и МСВР;

2. Методика определения умифеновира и трех его метаболитов в природной и сточной воде, активном иле и донных отложениях, основанная на сочетании возможностей техник ИСП-МС и МСВР.

3. Результаты исследования трансформации умифеновира, амброксола, бромгексина в условиях дезинфекции воды и оценки уровней содержания препаратов, а также их продуктов трансформации в реальных объектах.

**Степень достоверности результатов.** Значительный объем экспериментальных исследований с получением новых данных подтверждает достоверность результатов, согласующихся с теоретическими данными. Применение в работе аттестованных стандартных образцов фармацевтических препаратов, обработка данных хемометрическими методами, а также использование современных методов исследования и хромато-масс-спектрометрии. Публикацией обсуждений результатов исследования в высокорейтинговых научных журналах. На период проведения измерений все используемое оборудование имело актуальное свидетельство о периодической поверке.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования представлены на следующих научных конференциях: VI всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием 26 сентября – 2 октября 2021 г., г. Краснодар; IX всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» 18–22 октября 2021 г., г. Москва; 7<sup>th</sup> International Symposium Socratic Lectures 7 мая 2022 г., г. Любляна, Словения; IV съезд аналитиков России «Аналитика России» 25 сентября – 1

октября 2022 г., г. Москва; XII всероссийская научная конференция «Химия и технология растительных веществ» 29 ноября – 2 декабря 2023 г., г. Киров; X всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» 30 октября – 3 ноября 2023 г., г. Москва.

**Публикации.** По результатам научно-исследовательской работы опубликованы 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science, а также 7 тезисов докладов в материалах научных конференций.

**Личный вклад автора.** Заключается в проработке темы диссертации, планировании и проведении экспериментальных исследований. Автором обобщены, систематизированы литературные данные по теме диссертации, сформулированы цели и задачи исследования, выполнены экспериментальные и теоретические исследования по определению умифеновира, амброксола, бромгексина и идентификации побочных продуктов их дезинфекции, проведена интерпретация и обсуждение полученных результатов. Подготовлены доклады для выступления на профильных научных конференциях. В совместно опубликованных по научной теме работах, значительный вклад принадлежит соискателю.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, аналитического обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждений, списка использованных источников. Работа изложена на 114 страницах, содержит 26 рисунков, 13 таблиц и 185 источников.

**Финансовая поддержка.** Работа выполнена в рамках выполнения проекта Госзадания Министерства образования и науки РФ FSRU-2024-0007 с использованием оборудования ЦКП НО “Арктика” САФУ.

# 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

## 1.1 Дезинфекция сточных вод

Хозяйственно-бытовые, поверхностно-ливневые и технологические сточные воды отводимые от населенных пунктов через систему канализации в значительной степени загрязнены органическими соединениями и патогенами. Свободный сброс их в окружающую среду, согласно действующим нормативным документам, не допустим [1]. Предварительно они должны пройти процессы физической и биологической очистки, и последним обязательным этапом дезинфекцию [2–4]. Начальные этапы позволяют очистить сточные воды от твердых частиц минерального или органического происхождения, данные методы основаны на механической очистке металлическими сетками от посторонних предметов, а также фильтрации и осаждении [5]. В основе биологического этапа очистки лежит использование микроорганизмов, называемых активным илом, которые способны перерабатывать органические загрязняющие вещества [6–7]. Дезинфекция сточных вод является последней и крайне важной ступенью подготовки городских стоков [8]. Она позволяет уничтожить микроорганизмы-патогены и оставшиеся органические соединения, что необходимо для защиты водных экосистем и здоровья человека. В настоящее время для дезинфекции применяют различные технологии, основанные на обработке вод соединениями хлора, озоном и ультрафиолетом (УФ) [9–11]. Однако наибольшее распространение в мире, в связи с низкой себестоимостью и высокой эффективностью получили методы дезинфекции, основанные на обработке сточных вод соединениями хлора (газообразный хлор, гипохлорид или хлорамин). В последнее время, приоритет отдается гипохлориту, из-за более высокой безопасности в ходе транспортировки, хранения и эксплуатации [12]. Потребность сточных вод в хлорировании в значительной степени зависит от химического состава, средние концентрации активного хлора, применяемые для дезинфекции сточных вод, составляют порядка 3-30

мг/л [13]. Однако, несмотря на высокую эффективность для дезинфекции сточных вод [14], основным минусом применения соединений хлора, является образование побочных продуктов дезинфекции (ППД) [15].

## 1.2 Побочные продукты дезинфекции

ППД – это соединения, образующиеся в результате химической реакции между дезинфицирующим агентом (обычно активным хлором) и присутствующими в обрабатываемой воде органическими и неорганическими соединениями [16]. В результате дезинфекции хлорсодержащими реагентами могут образовываться азот (N-ППД), хлор (Cl-ППД), бром (Br-ППД) содержащие побочные продукты дезинфекции и другие. Данные соединения зачастую обладают высокой биологической активностью, повышенной токсичностью, мутагенными и канцерогенными свойствами [17–20]. Основными побочными продуктами хлорирования, образующимися в результате глубокой трансформации органического вещества в условиях избытка хлорирующего агента, являются: тригалогенметаны (ТГМ), галогенуксусные кислоты (ГУК) и галогенацетонитрилы (ГАН) [21]. Значительное влияние на процессы оказывает присутствие органических и неорганических соединений йода и брома в сточных водах, которые могут приводить к образованию Br-ППД и I-ППД, которые зачастую являются более токсичными относительно Cl-ППД аналогов [22–23]. Так, например, присутствующий в сточных водах бромид ион легко окисляется хлорноватистой кислотой до бромноватистой кислоты, которая является сильным бромирующим агентом [24]. В результате, дальнейшие реакции могут приводить к образованию Br-ППД и смешанных Br-Cl-ППД, например: трибромметан ( $\text{CHBr}_3$ ), дибромхлорметан ( $\text{CHBr}_2\text{Cl}$ ), бромдихлорметан ( $\text{CHBrCl}_2$ ).

Важным аспектом данной проблемы является присутствие в сточных водах эмерджентных (новых) загрязняющих веществ. Данные органические соединения взаимодействуют с активным хлором, в результате чего

образуются более токсичные формы соединений, чем исходные. В настоящее время, одним из таких источников поступления эмерджентных соединений, являются фармацевтические препараты (ФП) [25–26].

### **1.3 Фармацевтические препараты**

Фармацевтические препараты – представляют собой разнообразную группу химических веществ, в которую входят как рецептурные, так и безрецептурные лекарственные препараты, используемые для профилактики, диагностики или лечения заболеваний человека. Согласно реестру лекарственных средств России, фармацевтические препараты можно разделить на следующие фармакологические группы (табл. 1) [27].

Среди всех групп стоит выделить ФП, потребление которых значительно зависит от эпидемиологической обстановки, такие как: антибиотики, противовирусные препараты, противокашлевые и муколитические средства, и другие [28–30]. В периоды сезонных заболеваний и эпидемий, вследствие высокой заболеваемости и значительного роста потребления соответствующих лекарственных препаратов, в канализацию города могут поступать наибольшие количества исходных фармацевтических соединений, а также их метаболитов. Кроме того, среди данного перечня фармацевтических препаратов распространены соединения содержащие в химической структуре атомы элементов (например: азота, брома). Наличие данных элементов может оказывать большое влияние на биологическую активность и токсичность образующихся метаболитов и ППД [31].

Основным путем попадания фармацевтических препаратов в окружающую среду является использование их человеком. В результате естественных биологических процессов, лекарственные препараты в исходном виде или в форме метаболитов попадают в канализационную систему и затем вместе со сточными водами на очистные сооружения канализации города [32–33].

Таблица 1. Классификация фармакологических групп согласно государственному реестру лекарственных средств

<p>Вегетотропные средства <i>Адренолитические средства; Адреномиметические средства; и др.</i></p>
<p>Гематотропные средства <i>Антиагреганты; Антикоагулянты; и др.</i></p>
<p>Гомеопатические средства</p>
<p>Гормоны и их антагонисты <i>Андрогены, антиандрогены; и др.</i></p>
<p>Диагностические средства <i>Иммунобиологические диагностические средства; Контрастные средства; и др.</i></p>
<p>Иммунотропные средства <i>Вакцины, сыворотки, фаги и анатоксины; и др.</i></p>
<p>Интермедианты <i>Гистаминергические средства; Дофаминомиметики; Другие интермедианты; и др.</i></p>
<p>Метаболики <i>Анаболики; Антигипоксанты и антиоксиданты; и др.</i></p>
<p>Нейротропные средства <i>Анксиолитики; Антидепрессанты; и др.</i></p>
<p>Ненаркотические анальгетики, включая нестероидные и другие противовоспалительные средства <i>Анилиды; Бутилпипразолидины; Коксибы; и др.</i></p>
<p>Органотропные средства <b><i>Респираторные средства: Противокашлевые средства; Секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей; и др.</i></b></p>
<p>Противомикробные, противопаразитарные и противоглистные средства <b><i>Антибиотики; Противовирусные средства; и др.</i></b></p>
<p>Противоопухолевые средства <i>Алкилирующие средства; Антиметаболиты; и др.</i></p>
<p>Разные средства <i>Вспомогательные вещества, реактивы и полупродукты; и др.</i></p>
<p>Регенеранты и репаранты <i>Регенеранты и репаранты в комбинациях</i></p>

Проходя физические, биологические и химические процессы очистки сточных вод, поступающие загрязняющие вещества могут быть сорбированы осадками, трансформированы микроорганизмами или в ходе дезинфекции [34–35]. В конце очищенные сточные воды, содержащие не полностью

удаленные исходные соединения и продукты их трансформации поступают в окружающую среду.

Возможности физической фильтрации при очистке сточных вод от фармацевтических препаратов, а также их метаболитов ограничены. В связи с водорастворимостью большинства из них, единственным механизмом удаления на этом этапе может быть их сорбция осадком сточных вод. Наибольшая эффективность удаления ФП достигается на этапе биологической очистки. Здесь лекарственные средства по мимо сорбции, претерпевают биотрансформацию и биodeградацию в результате потребления органических соединений организмами активного ила [36–37]. В большинстве случаев после выведения из технологического процесса, обезвоженный осадок сточных вод в смеси с активным илом утилизируют путем вывоза на иловые карты. Данные отходы часто применяют в качестве удобрения для почв, так же, как и твердые биологические отходы животноводства [38–39]. Все они могут содержать исходные ФП, а также их метаболиты, которые далее могут вымываться в почву, усваиваться растениями или попадать в грунтовые и поверхностные воды. На последнем этапе обработки сточных вод, в результате дезинфекции, ФП, а также их метаболиты, могут образовывать ППД [40]. В связи с тем, что большинство фармацевтических препаратов, а также их метаболитов изначально являются биологически активными соединениями, образование ППД на этапе дезинфекции и поступление их в окружающую среду, может иметь негативные экологические последствия [41].

В настоящее время, фармацевтические препараты признаны псевдостойкими загрязняющими веществами, в связи с развитием медицины и распространённостью, они являются постоянно употребляемыми соединениями, которые регулярно поступают в канализацию и окружающую среду [42]. Даже в периоды низкого потребления, в сточные воды поступают значительные количества фармацевтических препаратов, а также их метаболитов [43].

## 1.4 Умифеновир, амброксол и бромгексин

Проблема попадания фармацевтических препаратов, а также их метаболитов в сточные воды стала особенно острой в связи с развитием пандемии, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2 (COVID-19) и приведшей к многократному увеличению потребления соответствующих противовирусных и симптоматических фармацевтических препаратов [44–45].

Помимо официально одобренных во время пандемии Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США ремдесивира, авиптадила и дексаметазона, список включает несколько других активных веществ, таких как фавипиравир, хлорохин (или гидроксихлорохин), азитромицин, рибавирин, лопинавир/ритонавир и т.д. [46]. В некоторых странах, и особенно на территории Российской Федерации, широкое распространение получил умифеновир (производное индола), этил-6-бром-4-[(диметиламино)метил]-5-гидрокси-1-метил-2-[(фенилсульфанил)метил]-1H-индол-3-карбоксилат) (рис. 1) – препарат наиболее известный под торговым названием «Арбидол» и используемый для профилактики и лечения COVID-19, а также некоторых других вирусных инфекций [47].

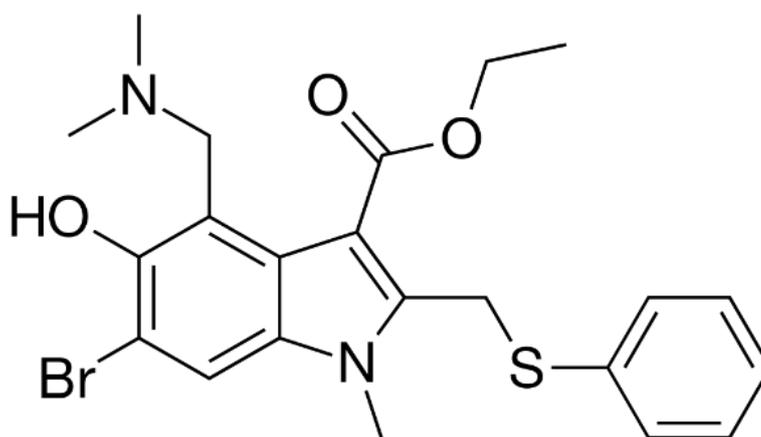


Рисунок 1 – Структурная формула умифеновира

Умифеновир характеризуется широким спектром действия против гриппа и первоначально был лицензирован для борьбы с этой инфекцией в России (1993 г.) и Китае (2006 г.). Кроме того, известно, что это соединение

эффективно в отношении герпеса человека, гепатитов В и С, вируса Эбола, ингибирует энтеровирус С и обладает антиоксидантной активностью [48–50]. Умифеновир обладает относительно низкой токсичностью для человека ( $LD_{50} > 4$  г/кг), в результате его профилактическая суточная доза была определена как 200 мг, тогда как терапевтическая доза достигает 800 мг/день при продолжительности приема 5 дней. Период полувыведения препарата в организме составляет 17–21 ч, ~ 40% выводится из организма в неизменном виде [51]. Образование метаболитов происходит путями N-деметилирования, S-окисления, гидроксилирования, и в основном сопровождается O-глюкуронидной и O-сульфатной конъюгации [52–54]. В недавнем исследовании [55] с помощью количественного соотношения структура-активность, моделирующего экотоксикологический риск, связанный с попаданием умифеновира в природные воды, оценен как высокий, а устойчивость живых организмов к противовирусному препарату – низкая.

Бромгексин (2-амино-3,5-дибром-N-циклогексил-N-метилбензиламин) и амброксол (2-амино-3,5-дибром-N-[транс-4-гидроксициклогексил]бензиламин) (рис. 2) являются классическими отхаркивающими и бронхосекретолитическими препаратами, также были рекомендованы для облегчения кашля и отхаркивания при симптомах, вызванных COVID-19 [56]. Кроме того, амброксол часто используется в качестве ингредиента средств для подавления кашля. Терапевтическая доза бромгексина для взрослого составляет от 8 до 32 мг/сут, амброксола – от 60 до 90 мг/сут. Период полувыведения амброксола составляет 3,3 часа, выводится почками: 90% в виде метаболитов, 10% в неизменном виде. Период полувыведения бромгексина составляет около 16 часов, 85-90% выводится преимущественно почками в виде метаболитов [57–58]. Бромгексин метаболизируется в основном посредством гидроксилирования, N-деметилирования и N-деалкилирования, в результате чего амброксол является одним из метаболитов бромгексина [59–61].

Таким образом, с учетом уровня заболеваемости коронавирусной инфекцией объемы умифеновира, амброксола, бромгексина, а также их метаболитов, попадающих в городские сточные воды, достаточно велики и для города с населением 1 миллион человек могут достигать нескольких десятков кг в сутки, даже без учета потребления для лечения других вирусных заболеваний.

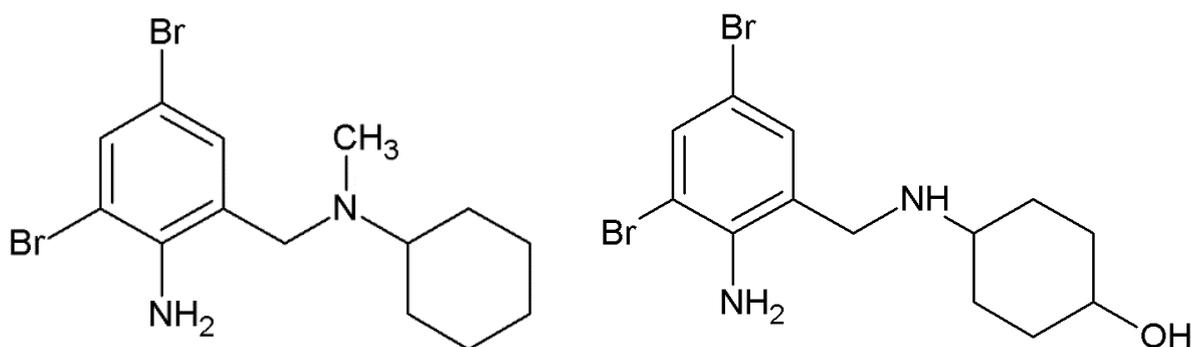


Рисунок 2 – Структурные формулы бромгексина (слева) и амброксола (справа)

Важным аспектом данной проблемы является наличие атомов брома в их химической структуре, что может приводить к образованию Br-ППД дезинфекции, обладающих высокой токсичностью. Однако, в настоящее время практически отсутствует информация о трансформации умифеновира, амброксола и бромгексина при процессах водного хлорирования.

Единственное исследование кинетики трансформации и образующихся ППД амброксола и бромгексина, [62] было представлено в 2022 году. Исследование ППД проводили методом газовой хроматографии с детектором электронного захвата. Помимо традиционных продуктов глубокой трансформации органических соединений, ТГМ и ГАН (трибромметан, дибромметан, бромдихлорметан, трихлорметан, дибромацетонитрил, бромхлорацетонитрил, трихлорацетонитрил и дихлорацетонитрил), впервые были обнаружены 2,4,6-триброманилин и 2-хлор-4,6-диброманилин. Таким образом, сделаны выводы, о значительном влиянии брома в структуре препаратов на образование широко круга Br-ППД, а также образовании нового

класса ППД при обработке амброксола и бромгексина активным хлором – галогенанилинов (ГА). Однако, данное исследование приводит новую информацию только о летучих продуктах трансформации фармацевтических препаратов.

Тем не менее, во время дезинфекции сточных вод, помимо летучих ППД, которые образуются в результате избытка дезинфицирующего агента и сильной деградации органических соединений, могут образовываться и промежуточные ППД. Они зачастую могут быть не летучими и термолабильными соединениями, образующимися на начальных этапах дезинфекции и в условиях недостатка активного хлора. Данные соединения могут иметь более высокую токсичность для живых организмов, относительно летучих ППД [63]. В результате для оценки загрязненности окружающей среды, наряду с исходными соединениями (амброксол, бромгексин, умифеновир), необходим контроль максимально широко перечня образующихся ППД.

### **1.5 Методы определения фармацевтических препаратов, их метаболитов и побочных продуктов дезинфекции**

Для определения фармацевтических препаратов, их метаболитов и побочных продуктов дезинфекции в реальных объектах, в связи с их низким содержанием, требуется предварительная пробоподготовка. В настоящее время для извлечения данных соединений применяют методы, основанные на твердофазной экстракции (ТФЭ), жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ), ультразвуковая экстракция (УЗЭ), другие подходы применяются значительно реже [64–65].

Традиционным методом для извлечения нормируемых ППД из питьевых, сточных и природных вод является ЖЖЭ, основанная на различном коэффициенте распределения ППД между исследуемым образцом и применяемым экстрагентом. Данный подход является стандартизированным методом ЕРА 551.1 для определения ППД, хлорсодержащих растворителей и

галоген содержащих пестицидов согласно агентству по охране окружающей среды США [66]. Преимущества метода заключаются в доступности растворителей, оборудования и низкой стоимости [67]. Обычно для ЖЖЭ используются неполярные органические растворители, не смешивающиеся с водой, в результате данный метод подходит для эффективного извлечения большинства нормируемых летучих и полунлетучих ППД. Метод ЖЖЭ с использованием различных растворителей успешно применяется для извлечения ТГМ, ГАН, галогенкетонов, ГАК и других соединений [68–73].

Метод ТФЭ широко применяется для извлечения фармацевтических препаратов, их метаболитов и ППД, как при исследовании поверхностных и грунтовых, питьевых вод, так и объектов с очень сложной матрицей – сточных вод [74–76]. Стоит отметить, что данный метод, позволяет извлекать преимущественно промежуточные ППД, определение которых методами ГХ может быть затруднено. В связи с этим, наибольшее распространение метод ТФЭ получил для извлечения преимущественно не летучих соединений, таких как фармацевтические препараты, а также их метаболиты. В результате данный подход является стандартизированным методом EPA 1694, агентства по охране окружающей среды США, для извлечения ФП из питьевых, природных и сточных вод [77]. Разнообразие коммерчески доступных сорбентов позволяет с высокой эффективностью и иногда селективностью (в зависимости от их физико-химических свойств) извлекать множество различных классов химических соединений. Наибольшую распространенность для извлечения ФП, их метаболитов и промежуточных ППД получили общие сорбенты гидрофильно-липофильного баланса, где в качестве сорбента выступает модифицированный (пирролидоном) стирол-дивинилбензолный полимер (например: Oasis HLB, BondElute PPL). Эффективность этих сорбентов не однократно подтверждена значительным количеством работ [78–80], аналогичный сорбент применяется в стандартизированном подходе [77]. Кроме извлечения ФП, а также их метаболитов, метод ТФЭ позволяет проводить эффективное извлечение, таких

ППД как: ТГМ, хлорфенилацетонирилы, ГАН и другие [81–83]. В отличие от ЖЖЭ, метод ТФЭ позволяет извлекать более полярные соединения, как йодуксусные и дийодуксусные кислоты, нитрозоамины [84–86]. Однако, благодаря возможности извлечения широкого круга соединений, основным недостатком применения метода ТФЭ является извлечение большого количества матричных соединений. Полученные экстракты, обычно анализируют методами ЖХ-МС, которые в свою очередь могут подвергаться значительному влиянию со стороны образцов со сложной матрицей.

Наиболее современным методом извлечения летучих ППД является ТФМЭ, этот подход предлагает уникальную комбинацию отбора проб и введения пробы в ГХ систему с помощью автосамплера [87]. Основными преимуществами метода является высокая степень автоматизации и отсутствие органических растворителей. Это приводит к значительному сокращению трудозатрат и времени, необходимых для подготовки по сравнению с классическими ТФЭ и ЖЖЭ [88]. Большое разнообразие сорбентов, а также их сочетаний позволяет проводить эффективное извлечение различных классов летучих и полуметучих ППД. Наибольшую распространенность получил сорбент на основе дивинилбензола/карбоксена/полидиметилсилоксана, который позволяет эффективно извлекать широкий круг ППД [89–90]. Метод ТФМЭ успешно применяется для определения ТГМ, ГАК и производных, галоген кетонов, ГАН и других соединений [91–95]. Несмотря на явные преимущества в определении летучих ППД, метод менее эффективен для фармацевтических препаратов, их метаболитов, а также промежуточных ППД в связи с малой летучестью и зачастую термолабильностью данных соединений.

Для извлечения фармацевтических препаратов из твердых объектов: донных отложений, твердых биологических отходов наиболее часто применяются УЗЭ [96–98]. В том числе в стандартизированной методике агентства по охране окружающей среды предлагается использование УЗЭ [77]. Основными преимуществами метода является простота оборудования,

высокая доступность и хорошая степень извлечения целевых аналитов. Последняя в большей степени зависит от применяемого экстрагента, времени обработки и количества повторений. Кроме целевых аналитов, метод позволяет извлекать из объектов со сложной матрицей в экстракт мешающие соединения. Это может оказывать сильное влияние при анализе образцов, методами подверженным матричным влияниям, например ИЭР-МСВР (масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением). Для устранения влияний применяют методы очистки и концентрирования, например ТФЭ подготовленных экстрактов, проводимую аналогично водным образцам [77]. Не менее важным фактором является температура проведения экстракции, обычно она осуществляется при комнатной температуре, что крайне важно для термолабильных соединений, таких как некоторые фармацевтические препараты [99].

В последнее время наибольшей популярностью для извлечения соединений из твердых объектов пользуется метод ЖЭД. Основными преимуществами данного подхода являются, высокая степень автоматизации, экспрессность и эффективность. Его успешно применяют для извлечения фармацевтических препаратов (антибиотиков, гормонов и др.) [100–105], Br-содержащих соединений (полибромированных диэтиловых эфиров) [106] из образцов активного ила и донных отложений. Обладая высокой эффективностью, кроме целевых аналитов метод извлекает значительное количество матричных соединений, которые могут привести к мешающим влияниям. В связи с этим, обычно применяются методы очистки экстрактов методом ТФЭ [77]. Однако, применение селективного и не подверженного этим влияниям метода, позволило бы сократить время пробоподготовки, без негативного влияния на точность и воспроизводимость анализа. Таким методом, в случае определения некоторых элемент-содержащих соединений может выступать ВЭЖХ-ИСП-МС.

Следовательно, не менее важной задачей является хроматографическое разделение и детектирование исследуемых соединений. Объекты

окружающей среды обладают сложным химическим составом, в результате количественный и качественный анализ ППД преимущественно основан на методах газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии [107–108], благодаря их высокой эффективности разделения, селективности детектирования, высокой экспрессности анализа и широкому спектру применения. Стоит отметить, что в основном проводят определение летучих ППД, для которых применяют методы газовой хроматографии [107–108]. Данный аспект является широко изученным, большое количество ППД установлено и содержание их в питьевых, сточных и природных водах нормируется [109–110]. Однако, в некоторых случаях применение метода ГХ позволяет обнаруживать новые летучие ППД. В связи с чем применение метода ГХ необходимо для полноты характеристики трансформации соединений в условиях водного хлорирования, установления возможности образования уже известных и новых летучих ППД. Определение ФП методом ГХ зачастую требует усложнения пробоподготовки и проведения дериватизации аналитов [111], или полностью невозможно из-за термолабильности биологически активных соединений. В связи с этим, метод преимущественно применяют для анализа традиционных (широко известных и нормируемых летучих ППД: ТГМ, ГАН, ГАК и других соединений [72, 112]. Для их детектирования методом ГХ возможно применение масс-спектрометрического детектированием (ГХ-МС) или детектора электронного захвата (ГХ-ДЭЗ), последний подход стандартизирован согласно методам [109–110]. Он является доступным, высокочувствительным и селективным для галоген содержащих аналитов. Основным недостатком данного детектора является возможность наложения сигналов неидентифицированных летучих ППД и не возможность детектирования соединений, не содержащих в своей структуре атомов галогена, например, таких как N-нитрозодиметиламин. Поэтому наибольшими преимуществами в этом направлении обладает масс-спектрометрическое детектирование, обладающее большей селективностью и позволяющее определять одновременно элюируемые соединения. Кроме того,

МС детектирование с электронной ионизацией (ЭИ), позволяет проводить идентификацию соединений с использованием библиотеки масс-спектров NIST [113]. В связи с тем, что в спектрах ЭИ может отсутствовать молекулярный ион, необходимый для идентификации новых ППД, иногда применяют более мягкий метод химической ионизации, например для определения ГАК и производных [114]. Для количественного определения летучих ППД, в связи с доступностью коммерческих стандартных образцов, в том числе дейтерированных, возможно применение различных методов детектирования. Наибольшее распространение имеет метод тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Он позволяет проводить высокоселективное и надежное определение аналитов в объектах окружающей среды со сложной матрицей [115]. Так, данный подход успешно был применен в работе [116] по исследованию бромированных и хлорированных производных гидроксифуранонов, в результате была показана высокая чувствительность и селективность данного метода при анализе реальных образцов. Кроме того, благодаря диссоциации, активированной соударениями (ДАС) и получению дополнительной информации о структуре по спектрам фрагментации, метод может быть использован для определения структуры новых ППД. В работе [117] с использованием данного подхода были идентифицированы новые ППД 1-аминокси-1-хлорбутан-2-ол и 1-аминокси-1-бромбутан-2-ол.

Тем не менее, наибольшими перспективами в данном аспекте обладает метод МСВР. Применение данного подхода позволяет проводить нецелевой скрининг и идентификацию неизвестных ППД. Последнее возможно на основании данных о точной массе исходной молекулы, по которой может быть произведен расчёт брутто формулы, а также масс-спектрам ДАС, которые способствуют уточнению структуры неизвестных соединений с высокой степенью надежности [118–119]. Так, например, с использованием ГХ-МСВР в плавательных бассейнах впервые были обнаружены и идентифицированы новые ППД: пентахлорацетон, пентабромацетон и трибромфуроевая кислота [120]. В работе [121] были исследованы ППД, образующиеся при водном

хлорировании лимонена (летучего соединения), методом ГХ-МСВР. В итоге было обнаружено и идентифицировано 27 летучих ППД. Применение сочетания методов ГХ-МСВР и ГХ-МС в исследовании хлорирования авабензона [122] позволило идентифицировать более 30 летучих ППД.

В свою очередь, отдельно можно выделить специфичный метод двумерной газовой хроматографии (ГХ×ГХ). Это многообещающий в сочетании с МСВР метод, который набирает популярность как инструмент для нецелевого скрининга соединений, загрязняющих окружающую среду. Разделение на двух газохроматографических колонках обеспечивает ортогональное разделение, что значительно увеличивает разрешающую способность и может обеспечить более надежное определение летучих ППД. В исследовании [123] этот метод был применен для нецелевого скрининга ППД в воде, в результате было предварительно идентифицировано более 500 соединений.

В случае определения промежуточных ППД, фармацевтических препаратов, а также их метаболитов, в связи с физико-химическими свойствами данных соединений, обычно применяется жидкостная хроматография. Данный метод широко применяется для разделения полярных, высокомолекулярных или термически лабильных соединений, которые не могут быть проанализированы с помощью ГХ. Примерами классов ППД, в лучшей степени определяемых методами ЖХ, являются ГАК [76], ГАН [124] и N-нитрозодиметиламин [125]. Наиболее часто применяют ВЭЖХ-МС, где в качестве источника ионизации используется ионизация электрораспылением (ИЭР) [126–127]. Метод ВЭЖХ-ИЭР-МС является стандартизированным для определения фармацевтических препаратов в объектах окружающей среды, согласно методике EPA [77]. Данный метод ионизации, относительно мягкий и позволяет сохранить структуру исходных ионов исследуемых соединений с минимальной фрагментацией. Это необходимо для установления предположительной структуры новых соединений. Наибольшая эффективность ИЭР наблюдается для небольших полярных молекул.

Для количественного определения фармацевтических препаратов, и в том числе ППД, в реальных образцах со сложной матрицей преимущественно применяют метод ЖХ-МС/МС в связи с его высокой селективностью. Например, в исследовании [76] обнаружили, что традиционный метод ЖЖЭ для определения моноиодоуксусной кислоты и дийодоуксусной кислоты имеет низкую степень извлечения, поэтому был разработан метод с извлечением аналитов ТФЭ и определением ВЭЖХ-МС/МС для шести йодированных уксусных кислот и ароматических йодированных ППД. Данный подход так же применяется для определения исходных фармацевтических соединений, потребляемых человеком, и поступающих на очистные сооружения канализации города. Например, в работе [128] применение ТФЭ в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС позволило провести определение фармацевтических препаратов (ибупрофен, салициловая кислота и др.) в объектах окружающей среды.

Однако, данные подходы ограничены в связи с необходимостью использования стандартных образцов. В этом аспекте, наиболее перспективными для обнаружения, идентификации и определения промежуточных ППД является метод ВЭЖХ-МСВР (с время пролетным масс-анализатором или ионной орбитальной ловушкой) [129–131]. Например, в исследовании [132] разработали высокопроизводительный метод анализа с использованием ВЭЖХ с времяпролетным масс-анализатором, чтобы идентифицировать ППД пептидного происхождения, а также их предшественников. В работе [133] подход, основанный на сочетании ТФЭ воды из плавательного бассейна с последующим детектированием ВЭЖХ-ИЭР-МСВР, позволил определить кокаמידопропилбетаин (основной компонент большого количества моющих средств) и 18 промежуточных ППД. В исследовании [134] проводили модельное хлорирование бензалкония хлорида, в результате, методом ВЭЖХ-МСВР было идентифицировано 7 промежуточных ППД. Стоит отметить, что МСВР – чувствительный и быстрый метод, позволяющий осуществлять нецелевой скрининг нелетучих

соединений с идентификацией структуры по точным массам и масс-спектрам фрагментации с высокой степенью достоверности. Например, в работе [135] методом ВЭЖХ-МСВР был проведен нецелевой скрининг водопроводной воды, в итоге было обнаружено 14 С1-ППД.

В настоящее время исследования в направлении ППД основаны на разработке новых подходов подготовки проб и сочетаний аналитических методов для разделения и обнаружения всё большего количества новых соединений. Большинство ППД, которые определяют с помощью традиционных методов ГХ, представляют собой низкомолекулярные летучие соединения. Тем не менее, ППД образующиеся в условиях недостатка активного хлора и на начальных этапах трансформации органического вещества, зачастую такими не являются. Методы ЖХ-МС, особенно с использованием более мягких методов ионизации, таких как ЭРИ, расширяют возможности идентификации и определения новых загрязняющих соединений в объектах окружающей среды, включая ППД. Однако количественная оценка образующихся ППД, наряду с их прекурсорами, в условиях отсутствия их коммерчески доступных стандартных образцов, требует разработки новых аналитических подходов и способов.

## **1.6 ВЭЖХ-ИСП-МС**

Наличие как минимум одного атома галогена (Br) в структуре амброксола, бромгексина и умифеновира, открывает возможность решения проблемы определения исходных бромсодержащих соединений и образующихся Br-ППД, применением масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Это становится возможным, благодаря высокой селективности, широкому линейному диапазону и низким пределам обнаружения ИСП-МС в элементном анализе, а его сочетание с хроматографической системой позволяет методу, проводить одновременно количественный и видовой анализ. Данный подход обычно используют для определения видообразования органических и неорганических форм

металлов: As (III), As (V), метилмышьяка и диметилмышьяка [136–139]; Hg (II), метилртути, этилртути, фенил ртути [140–144]; Cr (III) и Cr (VI) [145]; Sb (III), Sb (V) и триметилсурьмы [146–149] и других. Кроме металлов, ИСП-МС позволяет определять некоторые неметаллические элементы, несмотря на их высокие потенциалы ионизации. Так, высокотемпературной аргоновой плазмы вполне достаточно для эффективной ионизации таких элементов как: Br, I, Se. В результате чего ВЭЖХ-ИСП-МС успешно применяют для определения видообразования неметаллов: I,  $\text{IO}_3^-$  [150]; йодтиразина, дийодтиразина, трийодтиразина (Т3) и тироксина (Т4) [151]; Se (IV), Se (VI), метилселен [152], триметилселен [153] и селеносахара [154];  $\text{Br}^-$ ,  $\text{BrO}_3^-$  [155] и в том числе амброксола в крови [156].

Метод ИСП-МС обеспечивает ионизацию практически всех химических элементов независимо от химической структуры соединений и предоставляет информацию о качественном и количественном элементном составе, при этом основным недостатком метода является то, что структурная информация о молекулах теряется в высокотемпературной плазме [157]. Эту проблему можно преодолеть путем сочетания ИСП-МС с ВЭЖХ системой, в результате открывается возможность разделения разных форм соединений. Благодаря относительно высокой степени ионизации и большой молекулярной массе брома, метод ИСП-МС позволяет проводить его детектирование на низком уровне содержаний [158–159]. Кроме того, Br является пятым наиболее распространенным гетероэлементом в лекарственных препаратах, одобренных управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США [160], в результате метод обладает большими перспективами для определения данных соединений, а также их метаболитов и Br-ППД.

В связи с физико-химическими свойствами ФП для их разделения обычно применяют обращено-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ-ВЭЖХ). В качестве модификаторов подвижной фазы в ОФ-ЖХ используют органические растворители, наиболее часто метанол и

ацетонитрил. Однако метод ИСП-МС предназначен для анализа водных растворов, и введение органических растворителей в ИСП без модификации оборудования может привести к загрязнению внутренних интерфейсов углеродными отложениями и тушению плазмы. Согласно литературным данным [161–162], влияние органических растворителей можно устранить введением вспомогательного газа (кислорода) в аргоновую плазму. Данный подход позволяет дожигать органический углерод, что предотвращает образование отложений на внутреннем интерфейсе спектрометра. Однако, подача кислорода в высокотемпературную плазму требует применения более дорогостоящих инертных платиновых скиммер и сэмплер конусов, так как классические никелевые окисляются даже при малых долях кислорода в аргоновой плазме. Кроме того, добавление кислорода в плазму, может приводить к образованию дополнительных мешающих влияний в форме полиатомных интерференций [163].

Несмотря на возможность детектирования брома методом ВЭЖХ-ИСП-МС, для исследования бромсодержащих органических соединений (фармацевтических препаратов, их метаболитов, Вг-ППД) необходимо его сочетание с методами, позволяющими проводить видовую идентификацию соединений. В результате, наиболее перспективной комбинацией аналитических методов является сочетание ВЭЖХ-ИСП-МС с ВЭЖХ-МСВР [164]. Данное сочетание уже было успешно применено в исследовании профиля метаболитов противотуберкулезного бромсодержащего соединения ТМС207 [165], наличие атома брома в структуре позволило легко обнаружить производные лекарства методом ИСП-МС и провести их идентификацию методом МСВР. Применение изотопного разбавления, в исследовании [165] позволило провести количественную оценку не только исходного соединения, но образующихся метаболитов без индивидуальных стандартных образцов.

В связи с этим, подход, основанный на сочетании методов ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС предоставляет скрытые ранее возможности для нецелевого группового поиска бромсодержащих фармацевтических препаратов, а также

их метаболитов и ППД, проведения идентификации обнаруженных соединений и количественной оценки их содержания.

### **1.7 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования**

Аналитический обзор литературы показал проблему поступления больших количеств бромсодержащих противовирусных и муколитических фармацевтических препаратов (амброксола, бромгексина и умифеновира), а также их метаболитов со сточными водами на очистные сооружения канализации городов, возникающую на фоне развития сезонных заболеваний и эпидемий, в том числе COVID-19. В результате дезинфекции эмерджентные бромсодержащие соединения, могут образовывать более опасные и токсичные для окружающей среды ППД. Особые опасения вызывают Br-ППД, которые обладают более высокой токсичностью, относительно хлорсодержащих аналогов. В настоящее время отсутствуют знания о трансформации амброксола, бромгексина и умифеновира в результате процессов водного хлорирования. В связи с развитием пандемии и ростом потребления советующих препаратов, необходим, контроль поступления не только исходных препаратов, но также их метаболитов и Br-ППД в окружающую среду. В настоящее время, в основном контролируются низкомолекулярные ППД (ТГМ, ГАН, ГА и др.), контроль которых проводят методами газовой хроматографии. Кроме продуктов глубокой деградации, в результате трансформации препаратов могут образовываться промежуточные ППД, определение которых методом ГХ может быть затруднено. Информация об этих соединениях зачастую отсутствует, и необходим их поиск и идентификация. В случае количественного определения, ограничивающим фактором является отсутствие коммерчески доступных стандартных образцов, в первую очередь метаболитов и промежуточных Br-ППД. Благодаря наличию атомов брома в химической структуре исследуемых соединений, проблема

может быть решена применением сочетания методов ВЭЖХ-ИСП-МС и ВЭЖХ-МСВР.

В связи с этим, целью диссертационного исследования является – разработка новых подходов для определения бромсодержащих фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

## 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Оборудование

При проведении экспериментальных исследований использовали следующее научное оборудование и вспомогательную технику:

– Система ВЭЖХ-МСВР, состоящая из времяпролетного масс-спектрометра TripleTOF 5600+ («ABSciex», Канада) оснащенного источником ИЭР (Ионизации электрораспылением), а также жидкостного хроматографа LC-30 Nexera («Shimadzu», Япония), состоящего из вакуумного дегазатора DGU-5A, двух хроматографических насосов LC-30AD, автодозатора SIL-30AC, термостата колонки СТО-20А, контроллера системы СВМ-20А. Управление системой и анализ данных осуществляли с использованием программных пакетов Analyst, PeakView, MasterView и FormulaFinder («ABSciex», Канада).

– Система ВЭЖХ-ИСП-МС, состоящая из квадрупольного масс-спектрометра с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS Aurora Elite («Bruker», Германия) оснащенного коллизионно-реакционным интерфейсом подавления интерференций (КРИ), а так же жидкостного хроматографа LC-30 Nexera («Shimadzu», Япония), состоящего из вакуумного дегазатора DGU-5A, двух хроматографических насосов LC-30AD, автодозатора SIL-30AC, термостата колонки СТО-20А, контроллера системы СВМ-20А. Управление системой и анализ данных осуществляли с использованием программных пакетов LabSolutions 5.65 («Shimadzu», Япония), Quantum и Compass CDS («Bruker», Германия).

– Система ГХ-МСВР Exactive GC («Thermo Scientific», США), состоящая из газового хроматографа Trace 1310, автодозатора RSH TriPlus и масс-спектрометра высокого разрешения Orbitrap. Управление системой и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения TraceFinder («Thermo Scientific», США).

– Система ГХ-МСВР, состоящая из газового хроматографа Agilent 7890В («Agilent», США), автодозатора GERSEL MultiPurpose Sampler MPS robotic («Gersel», Германия) и времяпролетного масс-спектрометра Pegasus GC-HRT+ 4D («LECO», США). Управление системой и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения ChromaTOF («LECO», США).

– Ионный хроматограф, состоящий из ВЭЖХ LC-20 (Shimadzu, Япония), вакуумного дегазатора, хроматографического насоса LC-20ADsp, автосамплера SIL-20А, термостата колонки STO-20А и кондуктометрического детектора CCD-10Avp с системой подавления фона SeQuant CARS/SAMS (Merck, Германия).

– Система ускоренной экстракции растворителями ASE-150 («Dionex», США).

– Система автоматической твердофазной экстракции Sepaths UP («LabTech», Италия)

– Ультразвуковая ванна Сапфир ТТЦ («Сапфир», Россия)

## **2.2 Реактивы и материалы**

При проведении экспериментальных исследований использовали следующие химические реактивы и материалы:

– Стандартный образец амброксола гидрохлорида  $\geq 98.0$  % («Sigma-Aldrich», США)

– Стандартный образец бромгексина гидрохлорида  $\geq 98.0$  % («Sigma-Aldrich», США)

– Стандартный образец умифеновира гидрохлорида  $\geq 98.0$  % («Sigma-Aldrich», США)

– Метанол HPLC grade («Merck», Германия)

– Дихлорметан («PanReac», США)

– Ацетонитрил 0 сорт («Криохром», Россия)

- Муравьиная кислота  $\geq 96$  % («Sigma-Aldrich», США)
- Деионизованная вода с удельным сопротивлением 18,2 МОм·см, полученная с использованием системы Milli-Q Type 1 («Millipore», Франция)
- Аммиак водный ос.ч. («Компонент-Реактив», Россия).
- Соляная кислота ос.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Серная кислота ос.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Перманганат калия х.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Гидроксид натрия х.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Тиосульфат натрия х.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Йодид калия х.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный х.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Кислота ортофосфорная ос.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Гидроксид натрия х.ч. («Компонент-Реактив», Россия)
- Хлорид натрия х.ч. («ХИММЕД», Россия)
- Волокно для твердофазной микроэкстракции CAR/DVB/PDMS («Supelco», США)
- Картриджи для твердофазной экстракции BondElut PPL 200 мг («Agilent Technologies», США)
- Хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C18, 150 × 3 мм, размер частиц 3,5 мкм («Agilent Technologies», США)
- Хроматографическая колонка Nucleodur PFP column, 150 × 2 мм, размер частиц 1,8 мкм («Macherey-Nagel», Germany)
- Хроматографическая колонка Star-Ion A300 (Phenomenex, США)
- Аргон, газообразный, высокой чистоты 99,998 % («БС Технология», Россия)
- Гелий, газообразный, высокой чистоты 99,9999 % («ПТК Криоген», Россия)

– Азот, газообразный, высокой чистоты 99,999 % («ПТК Криоген», Россия)

### 2.3 Объекты исследования

Объекты исследования были отобраны на городских очистных сооружениях канализации города Архангельска в марте 2021 г. и ноябре 2022 г. года, а также из реки Хаторица (приток Северной Двины), в которую сбрасываются очищенные сточные воды. Очистные сооружения получают ( $\sim 27 \times 10^6$  м<sup>3</sup> в год, средний расход 3000 м<sup>3</sup>/ч) весь объем городских сточных вод включая хозяйственно-бытовые, поверхностно-ливневые и технологические. Принципиальная схема очистных сооружений канализации города Архангельска и места отбора образцов показаны на рисунке 3.

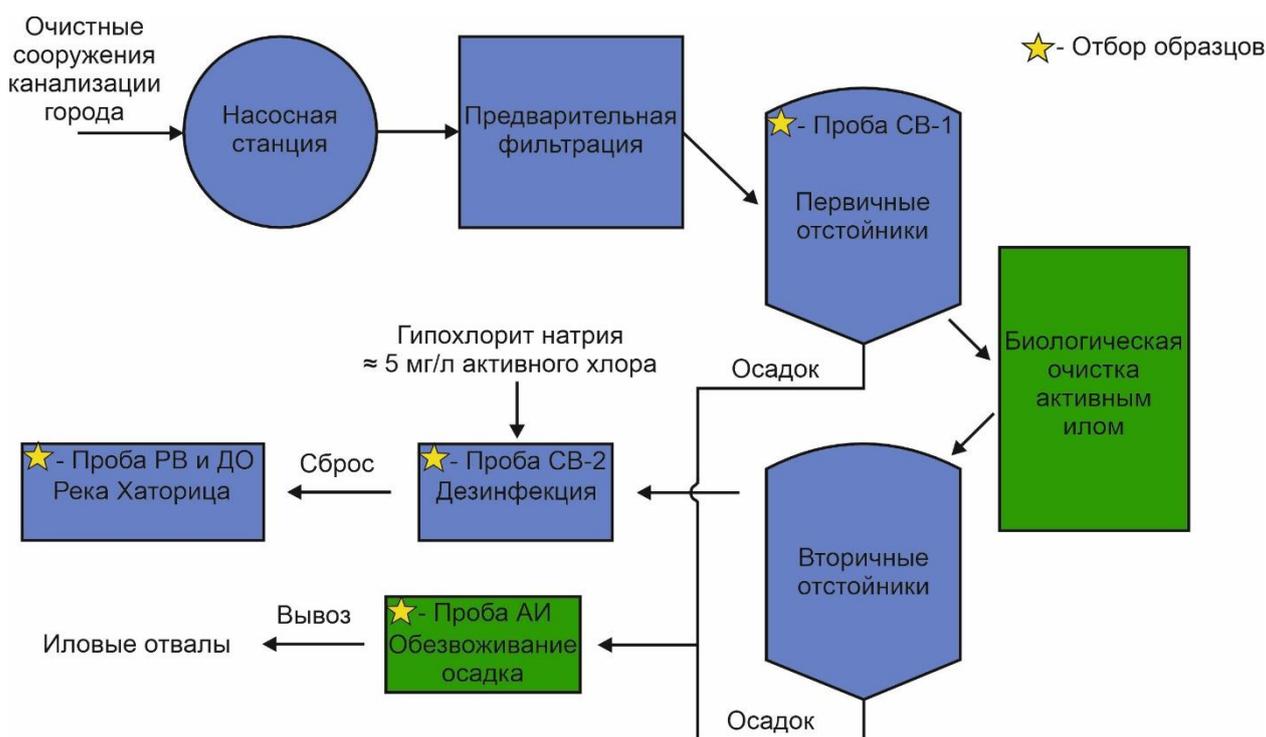


Рисунок 3 – Схема очистных сооружений канализации города Архангельска и места отбора образцов

Основные этапы очистки сточных вод: удаление механических примесей (предварительная очистка и отстаивание), биологическая очистка

активным илом, удаление биологического ила и отложений, обеззараживание гипохлоритом натрия, и сброс очищенных сточных вод.

**СВ-1** – образец сточной воды был отобран в бутылки из темного стекла объемом 3 л после этапа предварительной очистки и осветления исходных сточных городских вод, поступающих на очистные сооружения.

**СВ-2** – образец сточной воды был отобран в бутылки из темного стекла объемом 3 л после этапа обработки сточных вод гипохлоритом натрия (дезинфекции).

**АИ** – смесь осадка сточных вод с активным илом массой ~ 2 кг с влажностью 85 % отобрана на стадии обезвоживания осадка после биологической очистки. Образец помещали в пластиковый контейнер, герметично закрывали, хранили при температуре -20 °С и размораживали непосредственно перед анализом.

**РВ** – образец речной воды был отобран в бутылки из темного стекла объемом 3 л из реки Хаторица 2 км ниже по течению от места сброса очищенных сточных вод.

**ДО** – образец донных отложений был отобран в реке Хаторица в 2 км ниже по течению от места сброса очищенных сточных вод. Образец массой ~1 кг с влажностью 55 % помещали в пластиковый контейнер, герметично закрывали, хранили при температуре -20 °С и размораживали непосредственно перед анализом.

## **2.4 Модельное окисление и хлорирование**

Исходные растворы амброксола и бромгексина с концентрацией 1 г/л и умифеновира – 4 г/л были приготовлены в метаноле гравиметрическим методом. Рабочие растворы амброксола и бромгексина с концентрацией 10 мг/л при значении рН 7 и умифеновира – 20 мг/л при значении рН (4,3; 5,0; 6,0 и 7,0) готовили путем разбавления исходных растворов 100 мкл (50 мкл) в 10 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора. Для изучения превращения амброксола и бромгексина в условиях водного хлорирования к пяти рабочим

растворам добавляли раствор гипохлорита натрия для получения концентраций активного хлора 0 (контрольный образец), 1, 4, 7, 10 мг/л, для умифеновира – 0 (контрольный образец), 2, 8, 14, 20 мг/л. Аликвоты по 1 мл отбирали через определенные промежутки времени (0,5; 1; 5 и 10 минут) после введения активного хлора и сразу же смешивали с 10 мкл 0,05 М водного раствора тиосульфата натрия для остановки реакции. После центрифугировали образцы и подвергали хроматографическому анализу.

Исследование окисления умифеновира растворенным кислородом проводили, выдерживая такие же растворы, но без добавления гипохлорита натрия, при температуре окружающей среды ( $20 \pm 2$  °С) в темноте при непрерывном встряхивании в течение 10 дней. Периодически из каждой реакционной смеси отбирали аликвоты по 200 мкл и подвергали анализу. В дополнение к этим образцам был также исследован водный раствор умифеновира с концентрацией 1 г/л, контактировавший с воздухом в течение 3 месяцев.

Для изучения избыточного хлорирования готовили рабочие растворы амброксола и бромгексина с концентрацией 100 мг/л и умифеновира – 20 мг/л путем разбавления исходного раствора в 10 мл 50 мМ фосфатного буферного раствора. К рабочим растворам амброксола и бромгексина добавляли раствор гипохлорита натрия для получения концентраций активного хлора 0 (контрольный образец) и 1000 мг/л, к раствору умифеновира 0 (контрольный образец) и 100 мг/л. Протекание реакции останавливали через 30 минут путем добавления 400 мкл 0,1 Н водного раствора тиосульфата натрия. Затем отбирали аликвоту 5 мл, добавляли навеску хлорида натрия ~ 3 г и проводили газохроматографический анализ методом твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ).

## 2.5 Идентификация промежуточных продуктов трансформации

Установление элементных составов и идентификацию обнаруживаемых аналитов проводили методом ВЭЖХ-МСВР с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра TripleTOF 5600+.

Хроматографическое разделение амброксола и бромгексина осуществляли на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18, 150 × 3 мм, размер частиц 3,5 мкм («Agilent Technologies», США) при 40°C. Градиентное элюирование проводили с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты к воде (А) и метанолу (Б) по следующей программе: 0–1 мин: 15 % Б, 1–20 мин: линейное изменение Б до 100 %, 20–30 мин: 100 % Б. Скорость потока подвижной фазы 0,2 мл/мин, объем ввода – 5 мкл. Хроматографическое разделение умифеновира осуществляли на колонке Nucleodur PFP column, 150 × 2 мм, размер частиц 1,8 мкм («Macherey-Nagel», Germany) при 40 °С. Градиентное элюирование проводили с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты к воде (А) и метанолу (Б) по следующей программе: 0–1 мин: 25 % Б, 1–20 мин: линейное изменение Б до 100 %, 20–30 мин: 100 % Б. Скорость потока подвижной фазы 0,25 мл/мин, объем ввода – 5 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме генерации положительно заряженных ионов в условиях электрораспыления (ИЭР(+)). Использовали следующие параметры ионного источника: давление распыляющего и осушающего газа 40 psi, давление газа завесы 30 psi, напряжение 5500 В и температура источника 300 °С. Для повышения надежности идентификации аналитов записывали масс-спектры диссоциации, активированной соударениями (ДАС), в режиме информационно-зависимого эксперимента с энергией соударений 40 эВ и спредом 20 эВ. Критерием для записи МС/МС спектров являлось пороговое значение интенсивности сигнала иона-предшественника, равное 100 имп/с. Масс-спектры записывали в диапазонах масс 200–1000 Да (МС) и 20–1000 Да (МС/МС). Элементный состав определяли на основе точных масс и изотопного распределения ионов с использованием следующих ограничений: максимальное число атомов

C – 100, H – 300, O – 20, N – 5, Br – 2, S – 1, Cl – 5; P – 2, погрешность определения массы <5 м.д. (МС) и <10 м.д. (МС/МС), отношение сигнал/шум  $\geq 10$ . Калибровка шкалы масс в режимах МС и МС/МС выполнялась непосредственно перед анализом в автоматическом режиме с использованием в качестве эталона раствора формиата натрия. Управление масс-спектрометром, сбор и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Analyst, PeakView, MasterView и FormulaFinder («AB Sciex», Канада).

## 2.6 Идентификация продуктов глубокой трансформации

Идентификацию продуктов глубокой трансформации умифеновира проводили методом ГХ-МСВР на системе Exactive GC. Детектирование масс-спектров проводили в режиме сканирования ( $m/z$  40–500) с разрешающей способностью 30 000 (М/ΔМ, при  $m/z$  200) и частотой сбора данных 12 Гц. Использовали метод электронной ионизации (70 эВ). Температура трансферной линии и источника ионов составляла 280 °С и 200 °С, соответственно. Хроматографическое разделение проводили на капиллярной колонке TG-5SILMS («Thermo Scientific», США), 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм. Условия хроматографического разделения: скорость потока газа-носителя гелия высокой чистоты 1,2 мл/мин, режим ввода – деление потока 1:5. Температурная программа термостата: начальная температура 30 °С выдержка 3 мин, подъем температуры со скоростью 15 °С/мин до 280 °С, выдержка при конечной температуре 4 мин. Для отбора проб и концентрирования летучих органических соединений использовали метод твердофазной микроэкстракции с волокном CAR/DVB/PDMS («Supelco», США). Образцы выдерживали в течение 30 мин при температуре 50 °С с автоматическим перемешиванием. Десорбцию/инжекцию проводили при 250 °С в течение 2 мин. Масс-спектрометр калибровали с использованием в качестве стандарта перфтортрибутиламина, точность определения массы ниже 3 частей на

миллион (обычно <1 частей на миллион). Поиск продуктов проводили с помощью базы данных NIST 2020.

Идентификацию продуктов глубокой трансформации амброксола и бромгексина проводили методом ГХ-МСВР на системе Pegasus GC-HRT+ 4D. Детектирование осуществлялось в режиме непрерывного сканирования спектра в диапазоне  $m/z$  от 15 до 900. Скорость регистрации 40 спектров в секунду. Тип ионизации – ионизация электронами (70 эВ). Температура ионного источника 250 °С. Хроматографическое разделение осуществлялось на капиллярной колонке Rxi-5MS («Restek», США), 30 м × 0,25 мм, с толщиной слоя неподвижной фазы 0,25 мкм. Условия хроматографического разделения: скорость потока газа-носителя гелия высокой чистоты 1,2 мл/мин, режим ввода – деление потока 1:5. Температура инжектора 240 °С. Температурная программа термостата: начальная температура 40 °С, изотерма 1 мин, подъем температуры со скоростью 15 °С/мин до 300 °С, выдержка при конечной температуре 7 мин. Температура трансферной линии 320 °С. Общее время анализа – 60 мин. Отбор проб проводили методом ТФМЭ с волокном и параметрами, использованными в эксперименте с умифеновиром.

## **2.7 Количественное определение побочных продуктов дезинфекции**

Обнаружение и количественный анализ бромсодержащих фармацевтических препаратов и побочных продуктов дезинфекции проводили методом ВЭЖХ-ИСП-МС с использованием в качестве детектора системы Aurora Elite, оснащенной квадрупольным масс-анализатором и коллизионно-реакционным интерфейсом (КРИ). Использовали следующие параметры: мощность ВЧ-генератора – 1,6 кВт, глубина отбора – 5 мм, скорость потока плазмообразующего, вспомогательного, дополнительного и распыляющего газа (Ar) 18,0; 1,65; 0,23 и 0,8 л/мин соответственно, время сканирования – 500 мс. Детектирование проводили в режиме мониторинга выделенных ионов ( $m/z$  79 и 81). Водород и гелий высокой чистоты (20–50 мл/мин) использовали в качестве реагентов в КРИ. Количественное определение бромсодержащих

соединений проводили методом внешнего стандарта. Графики линейной калибровки были построены с использованием стандартных растворов умифеновира в диапазоне концентраций 1–10000 мкг/л (в пересчете на Br). Предел обнаружения (ПО) и нижний предел определяемых концентраций (НПОК) рассчитывали, как концентрации, обеспечивающие отношения сигнал/шум 3:1 и 10:1. Хроматографическое разделение проводили с использованием той же системы ВЭЖХ и хроматографических условий, что и в экспериментах ВЭЖХ-МСВР.

## **2.8 Количественное определение бромид-аниона**

Количественное определение бромид-аниона в реакционных смесях проводили методом ионной хроматографии с использованием системы ВЭЖХ LC-20 (Shimadzu, Япония). Хроматографическое разделение осуществляли на анионообменной колонке Star-Ion A300 (Phenomenex, США) при 30 °С. В качестве подвижной фазы использовали водный буферный раствор (1,7 мМ  $\text{NaHCO}_3$  + 1,8 мМ  $\text{NaCO}_3$ ) со скоростью потока 1 мл/мин.

## **2.9 Экстракция амброксола, бромгексина и умифеновира**

### **2.9.1 Предварительная оценка содержания аналитов**

Для предварительной оценки содержания исследуемых аналитов в сточной и природной воде применяли метод ТФЭ, в активном иле и донных отложениях – УЗЭ. Процедуры экстракции проводили, опираясь на методику EPA 1694. В случае ТФЭ, образец объемом 1 л доводили до значения pH 10, фильтровали через бумажный фильтр синяя лента. Затем образец пропускали через картриджи для твердофазной экстракции BondElut PPL. Элюирование проводили 6 мл чистого и 9 мл подкисленного (2%  $\text{HCOOH}$ ) метанола. Полученные экстракты упаривали до 500 мкл в токе высокочистого азота и центрифугировали. Для УЗЭ, в стеклянную коническую колбу помещали навеску образца 50 г и трижды экстрагировали 20 мл ацетонитрила, в течение 15 минут. Полученный экстракт упаривали до объема 10 мл в токе азота

высокой чистоты, фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр (0,2 мкм) и проводили хроматографический анализ.

### 2.9.2 Твердофазная экстракция

Извлечение фармацевтических препаратов и побочных продуктов дезинфекции из водных образцов проводили методом твердофазной экстракции (ТФЭ) на системе автоматической твердофазной экстракции Sepaths UP.

Образец доводили до значений pH 2 и 12 путем добавления концентрированной серной кислоты или гидроксида натрия, соответственно. До значений pH от 4 до 10 путем использования дигидрофосфата натрия для создания буферной системы и добавления к нему ортофосфорной кислоты или гидроксида натрия. Затем образец фильтровали через бумажный фильтр синяя лента, так чтобы конечный объем образца составлял 1 л. Доведенный до нужного значения pH и отфильтрованный образец пропускали со скоростью 10 мл/мин через картриджи для твердофазной экстракции BondElut PPL («Agilent Technologies», США) с 200 мг функционализированного стирол-дивинилбензолного полимерного сорбента. Предварительно картриджи были кондиционированы метанолом и деионизованной водой. После сорбции каждый картридж промывали деионизованной водой, сушили в токе высокочистого азота и элюировали 15 мл органических растворителей с добавками муравьиной кислоты и без добавок. Полученные экстракты упаривали до 500 мкл в токе высокочистого азота и центрифугировали.

### 2.9.3 Жидкостная экстракция под давлением

Извлечение фармацевтических препаратов и побочных продуктов дезинфекции из активного ила и донных отложений проводили методом жидкостной экстракции под давлением (ЖЭД) на системе ускоренной экстракции растворителями ASE-150. Образцы измельченного сухого активного ила или донных отложений навеской 2 г смешивали с 2 г

диатомовой земли и помещали в 10 мл экстракционную ячейку из нержавеющей стали. Проводили три цикла экстракции по 10 минут каждый различными растворителями с добавками муравьиной кислоты, гидроксида аммония и без добавок, при температурах от 100 до 140 °С и давлении 100 бар в атмосфере азота высокой чистоты. Полученный экстракт (~ 25–35 мл) упаривали до объема 10 мл в токе азота высокой чистоты, фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр (0,2 мкм) и проводили хроматографический анализ.

## 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Изучение трансформации умифеновира

Наиболее жесткими условиями, способствующими трансформации компонентов сточных вод, является обеззараживание воды активным хлором. Для установления путей трансформации умифеновира в условиях водного хлорирования и надежной идентификации образующихся продуктов без введения дополнительных стадий предварительного концентрирования были проведены модельные эксперименты с относительно высокой исходной концентрацией исходного соединения (20 мг/л). Соотношение массовых концентраций активного хлора и умифеновира варьировали в диапазоне 0–500 % при уровнях pH (4,3; 5,0; 6,0 и 7,0) близком к реальным значениям для муниципальных сточных вод (5–7,5).

Реакция умифеновира с гипохлоритом протекала чрезвычайно быстро, что делало невозможным изучение кинетики процесса. Даже при недостатке активного хлора образование обнаруживаемых используемыми аналитическими методами продуктов реакции завершается к моменту первого отбора проб (30 с после начала реакции), после чего перечень определяемых метаболитов и площади соответствующих хроматографических пиков остаются постоянными на протяжении всего эксперимента (10 мин). Это наблюдение хорошо коррелирует с описанной в литературе высокой антиоксидантной активностью умифеновира, сравнимой с активностью такого широко известного эталонного соединения, как Тролокс [47]. Таким образом, основным параметром, определяющим пути трансформации умифеновира, является дозировка гипохлорита. Это хорошо видно на диаграмме зависимости отношения активного хлора/умифеновира от количества бромсодержащих продуктов (рис. 4), проходящей через максимум (16 соединений, включая бромид-анион) при концентрациях активного хлора около 50 %.

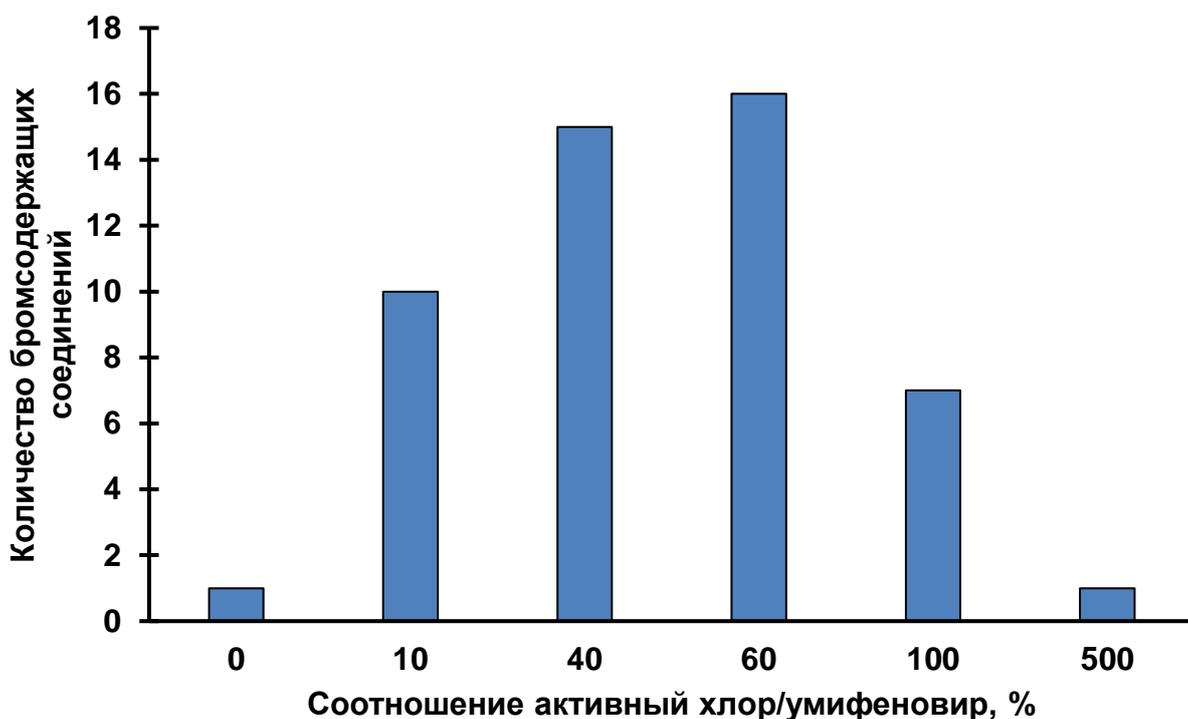


Рисунок 4 – Количество бромсодержащих соединений, обнаруженных в реакционных смесях при разных соотношениях активный хлор/умифеновир

Дальнейшее увеличение дозировки активного хлора приводит к быстрому уменьшению количества обнаруживаемых продуктов, а в случае пятикратного избытка в реакционной смеси с помощью прибора ВЭЖХ-ИСП-МС обнаруживается только неорганический бром. Стоит отметить, что не содержащие бром продукты превращения не были обнаружены в реакционных смесях в заметных количествах – хроматограммы, полученные методами ВЭЖХ-ИЭР-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС, практически идентичны (рис. 5).

Это означает, что потеря брома происходит только на поздних стадиях деградации умифеновира, сопровождаясь, по-видимому, образованием простейших и высокополярных продуктов, элюируемых с фронтом. Наличие брома во всех продуктах, образующихся на начальных стадиях превращения умифеновира, позволяло надежно обнаруживать и количественно определять их в сложных матрицах в отсутствии аналитических стандартов побочных продуктов дезинфекции за счет комбинированного использования методов ИЭР-МСВР и ИСП-МС [166].

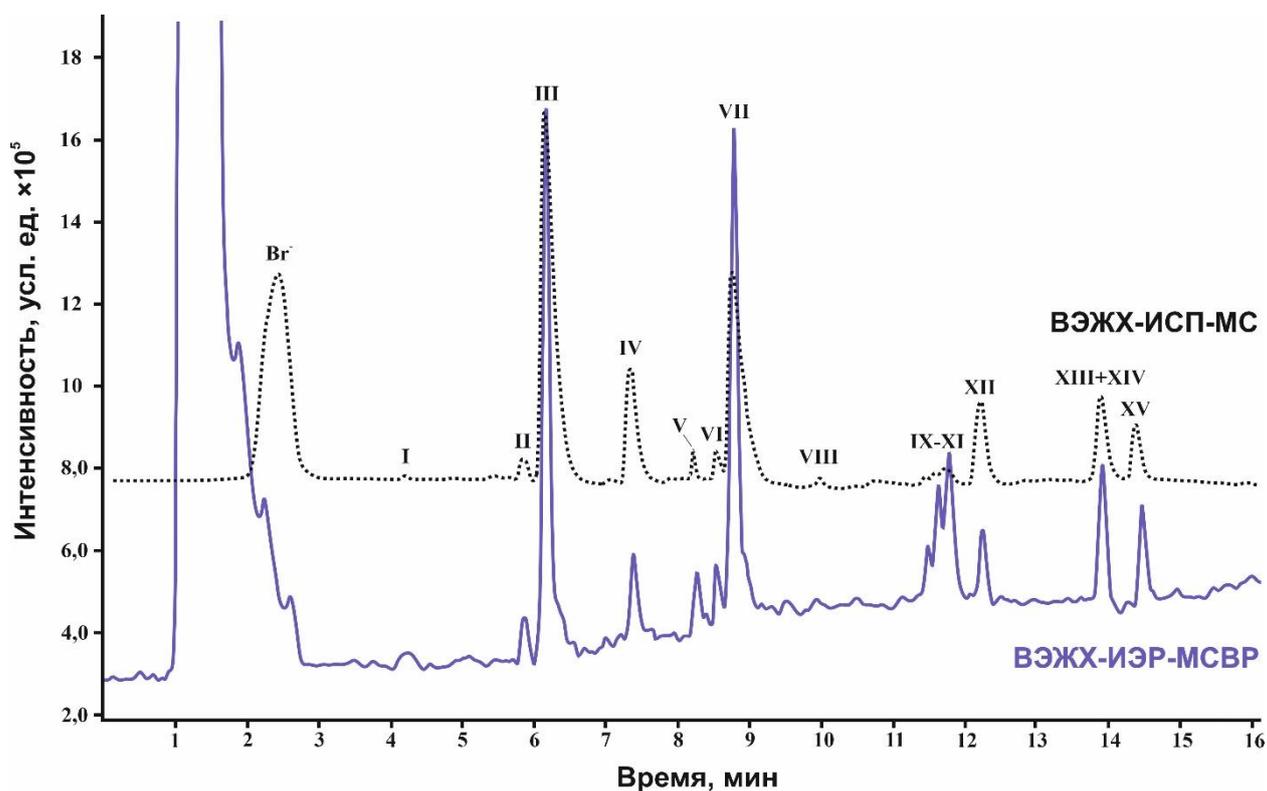


Рисунок 5 – Хроматограммы реакционных смесей модельного хлорирования умифеновира полученные методами ВЭЖХ-ИЭР-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС

Точные массы в спектрах МС и МС/МС, изотопные распределения и данные тандемной масс-спектрометрии пятнадцати соединений, обнаруженных в реакционных смесях с помощью ВЭЖХ-ИЭР-МСВР позволили получить их элементный состав (табл. 2), провести предварительную идентификацию и предложить схему превращения умифеновира под действием активного хлора (рис. 11). Принимая во внимание молекулярную структуру умифеновира, следует учитывать два основных типа реакции: электрофильное замещение и перенос одного электрона. Именно эти реакции наиболее характерны при взаимодействии ароматических соединений с галоген кислородными кислотами [167–168]. Однако, учитывая, что незамещенным остается только один центр в индольном фрагменте, наиболее предпочтительной представляется реакция переноса электрона, приводящая к окислению субстрата. Более того, помимо возможных пространственных ограничений, совместное действие других заместителей не способствует электрофильному замещению в единственное свободное положение.

Таблица 2. Времена удерживания, элементный состав и  $m/z$  ионов-предшественников продуктов трансформации умифеновира обнаруженных методом ВЭЖХ-ИЭР-МСВР

Продукт	$t_R$ , мин	Элементный состав	$m/z$	Ошибка м.д., МС	Ошибка м.д., МС/МС
I	4,16	$C_{16}H_{21}BrN_2O_5$	401,0702	-1,1	4,8
II	5,98	$C_{15}H_{19}BrN_2O_4$	371,0609	1,1	2,3
III	6,28	$C_{16}H_{21}BrN_2O_4$	385,0756	-0,4	0,7
IV	7,53	$C_{16}H_{22}BrN_2O_7P$	465,0422	-1,0	0,7
V	8,39	$C_{17}H_{23}BrN_2O_4$	399,0912	-0,7	0,9
VI	8,68	$C_{21}H_{23}BrN_2O_4S$	479,0637	-0,6	2,4
VII	8,89	$C_{22}H_{25}BrN_2O_4S$	493,0792	-0,2	0,6
VIII	10,01	$C_{22}H_{25}BrN_2O_6S$	525,0686	-1,2	2,9
IX	11,73	$C_{13}H_{11}BrClNO_3$	343,9682	-0,5	0,9
X	11,76	$C_{13}H_{13}BrClNO_4$	361,9785	-0,9	2,8
XI (Умифеновир)	11,79	$C_{22}H_{25}BrN_2O_3S$	477,0840	-0,6	1,3
XII	12,35	$C_{13}H_{14}BrNO_5$	344,0118	-2,1	4,1
XIII	13,89	$C_{19}H_{17}BrClNO_4S$	469,9822	-1,7	0,5
XIV	13,96	$C_{19}H_{18}BrNO_4S$	436,0211	-0,4	4,5
XV	14,42	$C_{19}H_{18}BrNO_5S$	452,0152	-2,0	3,7

Очевидно, из-за высокой реакционной способности органических сульфидов на начальном этапе превращения умифеновира XI (рис. 6) участвуют два пути реакции, приводящие к образованию двух родственных типов продуктов: сульфоксид VII (рис. 7) возникает за счет окисления тиоэфирной группы до сульфоксидного фрагмента, а разрыв связи C-S приводит к продукту III (рис. 8) с концевой гидроксильной группой. Последний является основным продуктом трансформации и выступает в качестве предшественника для образования многочисленных дальнейших продуктов. Отщепление всего метилтиофенольного фрагмента приводит к образованию соединения II с гидроксильной группой в положении 2 индольного кольца. Соединение VII участвует в качестве предшественника в нескольких реакциях.

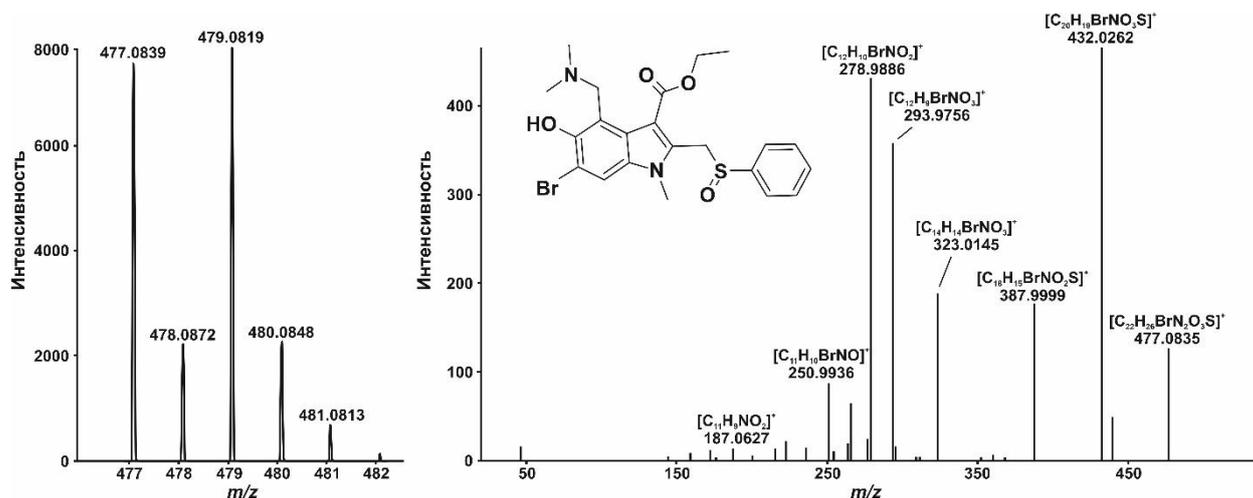


Рисунок 6 – МС и МС/МС спектры Продукта XI

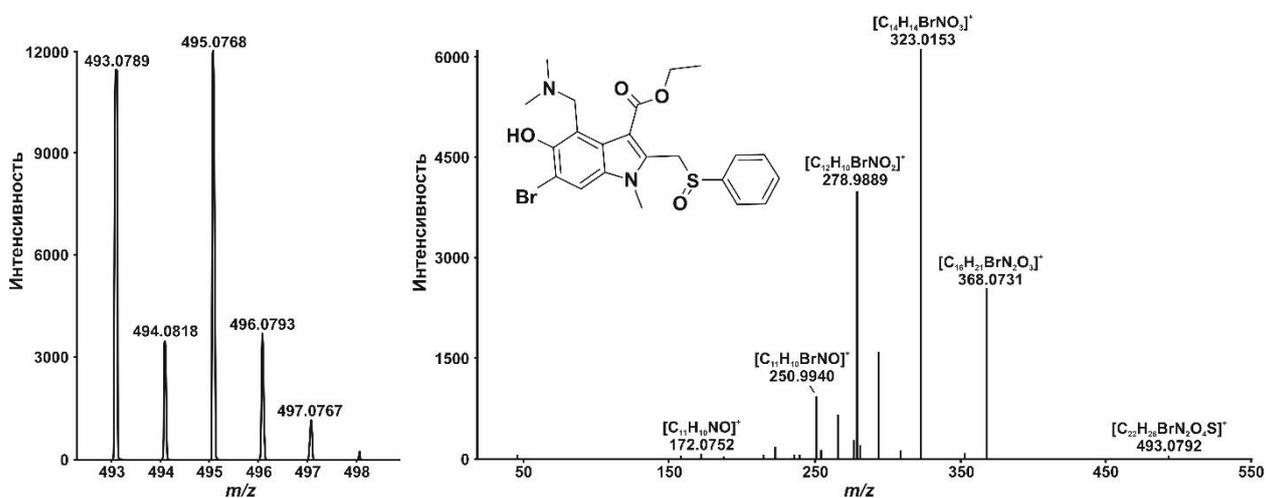


Рисунок 7 – МС и МС/МС спектры Продукта VII

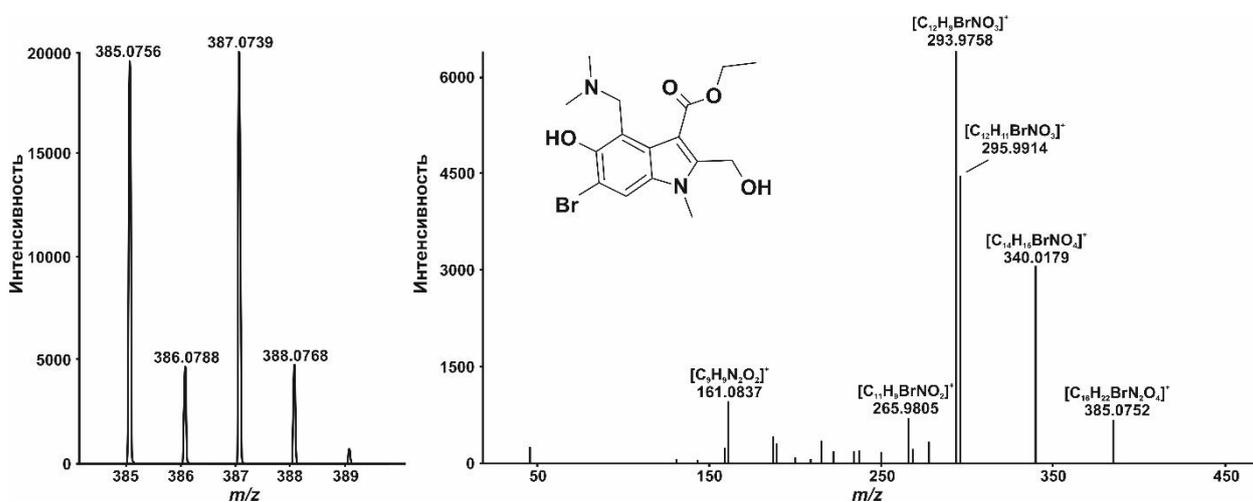


Рисунок 8 – МС и МС/МС спектры Продукта III

Окисление приводит к образованию продукта VIII. Довольно специфический процесс включает деметилирование алкиламиновой группы (Продукт VI, рис. 9).

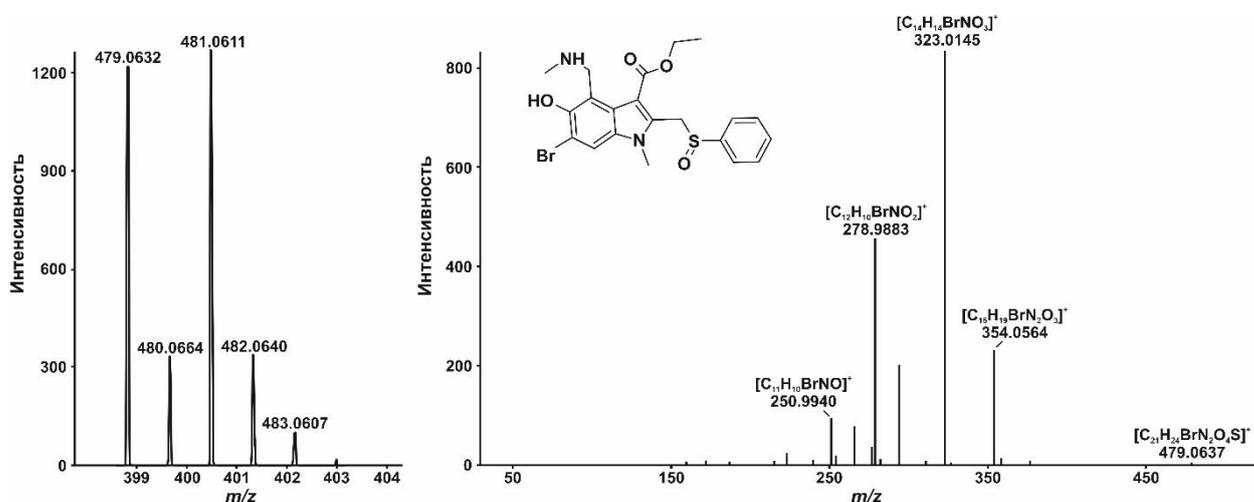


Рисунок 9 – MS и MS/MS спектры Продукта VI

Предложить механизм такого превращения достаточно сложно, однако точные массы и картина фрагментации в режиме MS/MS не оставляют сомнений в структуре этого продукта. Аналогичная реакция деэтилирования диэтиламинового фрагмента недавно наблюдалась при исследовании водного хлорирования гексил-2-[4-(диэтиламино)-2-гидроксибензоил]бензоата УФ-фильтра [169]. Отщепление всего фрагмента триметиламина приводит к образованию продукта XIV. Этот процесс может сопровождаться одновременным присоединением в ароматический цикл гидроксильной группы (Продукт XV) или атома хлора (Продукт XIII). Соединение III демонстрирует способность к гидроксильрованию (Продукт I), хотя соответствующий хлорированный продукт не обнаружен. Аналогично упомянутому выше процесс отщепления триметиламинового фрагмента приводит к соответствующим гидроксильным (Продукт XII) и хлорзамещенным соединениям (Продукт X). Хлорированные соединения XIII и X можно рассматривать как соединения, образованные электрофильным замещением на хлор триметиламинового фрагмента. Гидроксильная группа в орто-положении сильно способствует реализации этого процесса. Подобные

реакции замещения на галоген в условиях обеззараживания воды известны в литературе [170]. Продукт IX, имеет следующий элементный состав:  $C_{13}H_{11}BrClNO_3$ . При его образовании происходит отщепление молекулы воды от соединения X. Интересно, что в ДАС спектре продукта X потеря молекулы воды также весьма выражена. Если бензильный гидроксил представляет собой легко удаляемую группу, то источник водорода не очевиден. Он может исходить от соседней группы N-CH<sub>3</sub>. Структура образующегося соединения остается неизвестной, однако можно предположить образование 7-членного азепинового кольца (рис. 10).

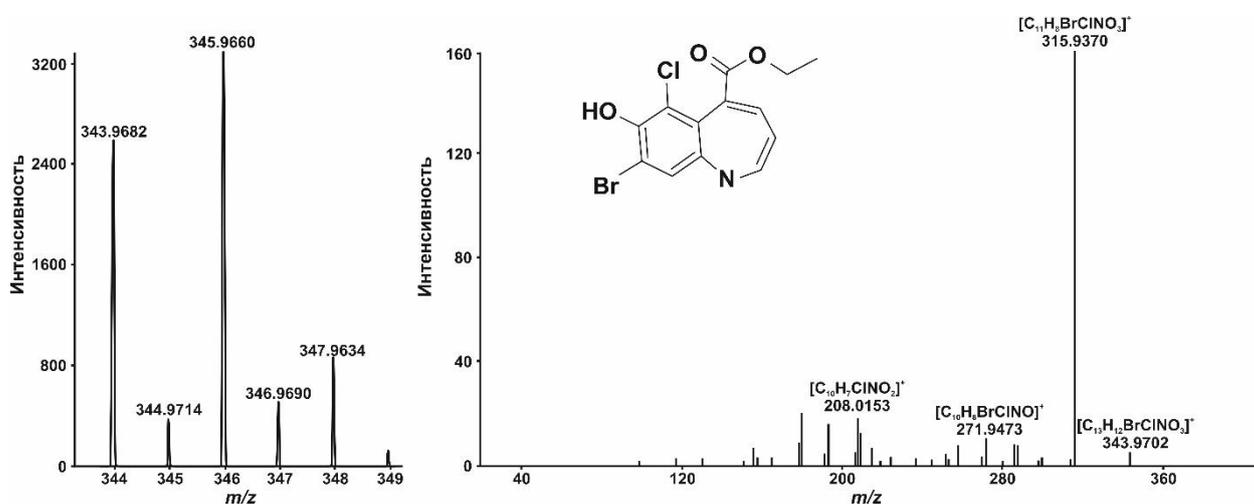


Рисунок 10 – MS и MS/MS спектры Продукта IX

Следует отметить, что реакционноспособная бензильная гидроксильная группа соединения III также участвует в побочных реакциях с анионами фосфата (компонент буферного раствора) и метанола (растворитель умифеновира), приводя к образованию фосфорилированных и метилированных производных IV и V, соответственно.

Исходя из вышеизложенного, очевидно, что при водном хлорировании умифеновира процессы окисления значительно преобладают над электрофильным замещением [171]. Всего в реакционных смесях в качестве минорных компонентов обнаружено только три хлорсодержащих соединения (IX, X и XIII). Примечательно, что все они образовались при замещении триметиламинной группы на атом хлора, при этом атомы водорода в

индольном ядре (орто-положение к Br), алифатических группах и бензольном кольце тиофенольного фрагмента остались незамещенными хлором.

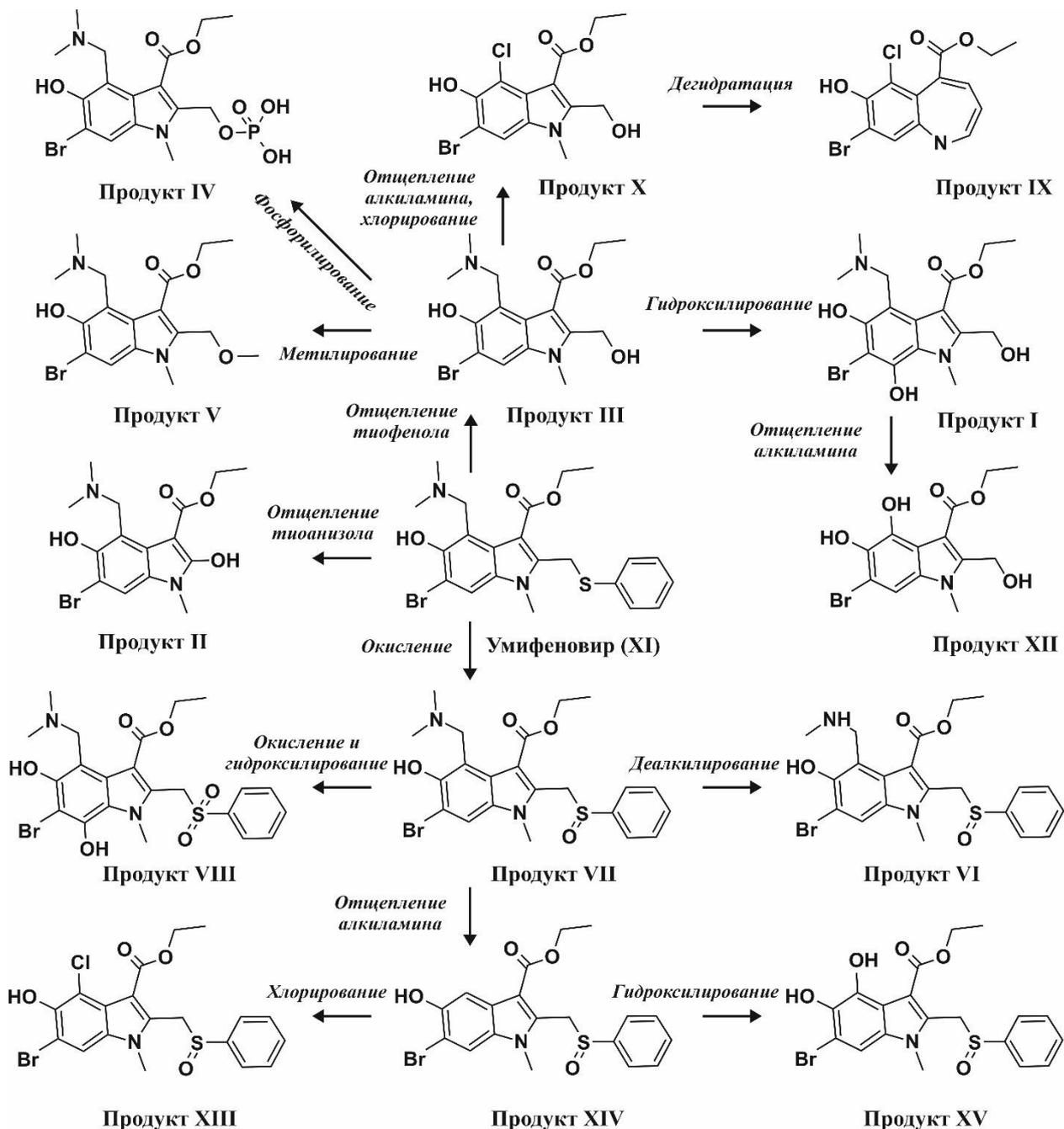


Рисунок 11 – Схема трансформации Умифеновира

Список обнаруживаемых продуктов хлорирования отличается от такового для метаболитов умифеновира, образующихся в организме человека [52–172]. Вместо многочисленных конъюгатов с углеводами, сульфатированных и ацетилированных производных водное хлорирование приводит к образованию значительного массива соединений без

тиофенольного фрагмента. Тем не менее четыре соединения (III, VI, VII, VIII), в том числе основные обнаруженные продукты трансформации III и VII, образуются как при хлорировании, так и под действием ферментов организма человека и могут поступать в природные воды из этих двух источников.

Уровни концентрации продуктов превращения умифеновира в реакционных смесях зависят от двух важнейших параметров – pH раствора и дозировки гипохлорита (соотношение умифеновир/активный хлор). Первый фактор существенно влияет на реактивность противовирусного препарата, определяя как равновесие между молекулярным хлором и гипохлорит-ионом, а также протолитические равновесия с участием кислой фенольной группы и алкиламинового заместителя с высоким сродством к протону в структуре умифеновира.

Таблица 3. Концентрации (С, мг/л) и массовые доли (МД, %) умифеновира и бром содержащих продуктов трансформации, обнаруженных в реакционных смесях при разном соотношении активный хлор/умифеновир методом ВЭЖХ-ИСП-МС (P=0,95; n=3)

Продукт	Соотношение активный хлор/умифеновир, %									
	0		10		40		60		100	
	С	МД	С	МД	С	МД	С	МД	С	МД
Br <sup>-</sup>	-	-	0,64	3,9	1,3	10,5	2,3	29,0	3,2	70,6
I	-	-	-	-	0,03	0,3	0,08	1,1	-	-
II	-	-	0,02	0,1	0,12	1,0	0,18	2,3	-	-
III	-	-	1,5	9,3	4,0	32,2	0,41	5,1	-	-
IV	-	-	0,45	2,7	1,2	10,1	0,17	2,1	-	-
V	-	-	0,36	2,2	0,10	0,8	0,14	1,8	0,18	4,0
VI	-	-	-	-	0,10	0,8	0,25	3,1	0,37	8,2
VII	-	-	0,90	5,4	3,0	24,8	0,48	6,0	0,62	13,8
VIII	-	-	-	-	0,06	0,5	0,05	0,7	0,08	1,9
IX	-	-	0,02	0,1	0,07	0,5	0,10	1,3	-	-
X	-	-	0,18	1,1	0,59	4,8	0,58	7,2	-	-
XI (Умифеновир)	20	100	12,2	73,1	0,08	0,7	-	-	-	-
XII	-	-	0,13	0,8	0,46	3,7	1,0	12,4	-	-
XIII+XIV	-	-	0,11	0,7	0,75	6,1	0,90	11,2	0,04	0,8
XV	-	-	0,11	0,6	0,40	3,3	1,3	16,7	0,03	0,6

Результаты анализа реакционных смесей методом ВЭЖХ-ИСП-МС (табл. 3, рис. 12–13) демонстрируют быстрое увеличение концентрации неорганического брома с увеличением рН за счет дальнейшего распада двух первичных продуктов III и VII. Концентрации продуктов XIII, XIV и XV, образующихся при отщеплении алкиламиновой группы от соединения VII, остаются неизменными или даже увеличиваются.

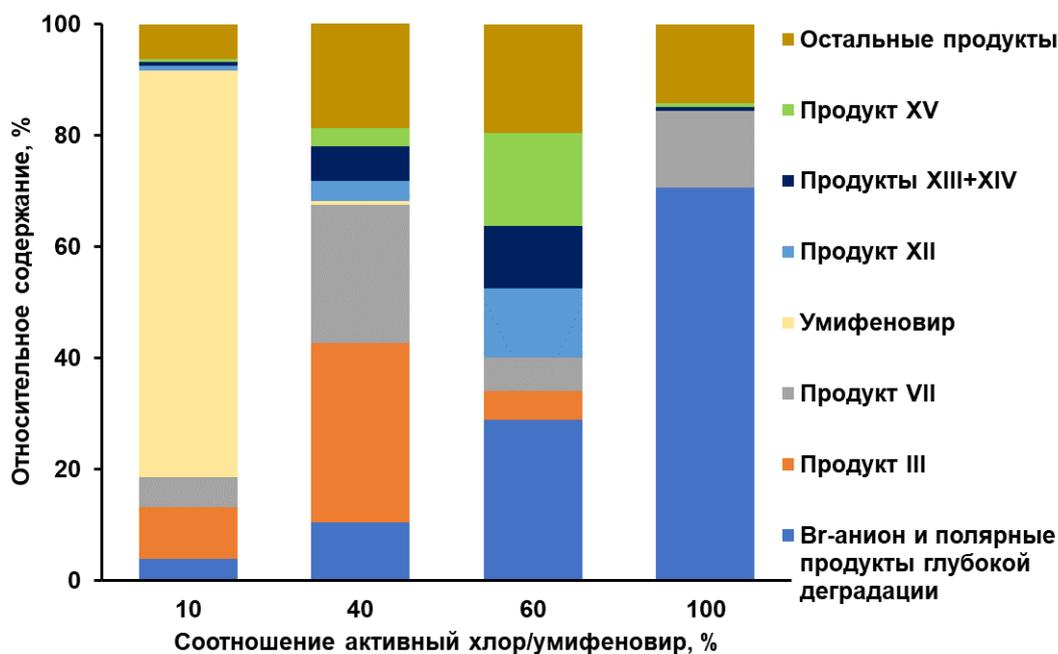


Рисунок 12 – Влияние соотношения активный хлор/умифеновир на относительное содержание бромсодержащих продуктов трансформации умифеновира

Аналогичная тенденция наблюдается и при увеличении дозы гипохлорита, так как концентрация неорганического брома быстро возрастает и достигает 70 % от общего содержания всех продуктов превращения при достижении соотношения активный хлор/умифеновир 100 % (рН 5). Параллельно происходит увеличение содержания вторичных продуктов деградации (XIII, XIV, XV) до тех пор, пока дозировка активного хлора не достигнет 60 к умифеновиру, а содержание исходного вещества становится незначительным уже при соотношении 40 %.

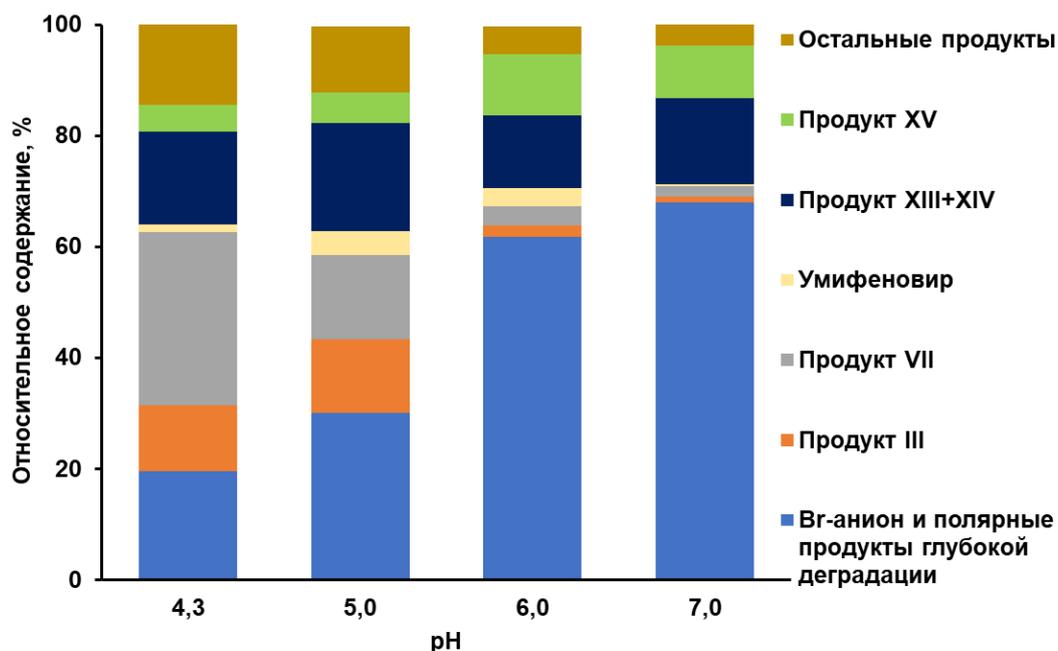


Рисунок 13 – Влияние рН на относительное содержание бромсодержащих продуктов трансформации умифеновира

Кроме того, для определения возможности образования побочных продуктов трансформации не только в ходе метаболизма человеком или процессов дезинфекции сточной воды, был проведен эксперимент по окислению умифеновира кислородом воздуха. Учитывая высокую антиоксидантную активность умифеновира, можно было ожидать его эффективного окисления под действием растворенного кислорода. Однако анализ водных растворов умифеновира с разным рН, находившихся в контакте с воздухом, показал низкую скорость трансформации препарата. Даже через 10 дней в реакционной смеси осталось только два первичных продукта превращения (VII и III), также характерных для обработки активным хлором. Скорость окисления увеличивается с повышением кислотности среды и при рН 5 содержание каждого продукта достигает 3–4 % от исходного количества умифеновира. Более длительный контакт с кислородом воздуха (90 сут) не привел к существенному изменению концентраций соединений VII и III. Однако, в достаточно значительных количествах (1,4 мг/л или 7 % от исходного умифеновира) был обнаружен новый продукт XVI с временем

удерживания 9,06 мин и элементным составом  $C_{16}H_{21}BrN_2O_3$  (ошибка, -3,9 м.д.). Спектр МС/МС (рис. 14) позволил предварительно идентифицировать его как метаболит со структурой, аналогичной продукту III, с заменой фрагмента  $CH_2OH$  на  $CH_3$ .

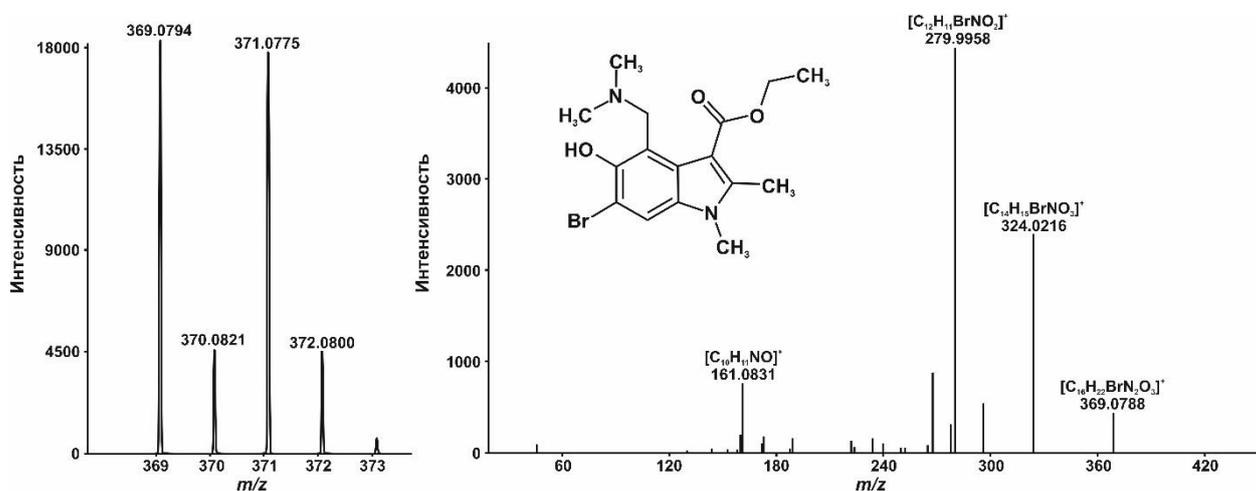


Рисунок 14 – МС и МС/МС спектры продукта XVI

Этот вывод может быть подтвержден отсутствием потери фрагмента  $CH_2OH$  в ДАС (в отличие от соединения III). Скорее всего, он образуется в условиях значительного избытка умифеновира по отношению к окислителю. Таким образом, превращения умифеновира в реакциях с растворенным кислородом можно выразить простой схемой (рис. 15), включающей окисление тиоэфира до сульфоксида, а также отщепление тиофенольного фрагмента с образованием концевых метильных или гидроксиметильных групп. Для изучения химического состава продуктов глубокой деградации умифеновира, не обнаруженных методом ВЭЖХ-ИЭР-МСВР из-за их низкой молекулярной массы, неспособности к ионизации в условиях электрораспыления и плохого удерживания на обращенной стационарной фазе, был использован метод ТФМЭ-ГХ-МСВР. Четырнадцать идентифицированных соединений были представлены тригалогенметанами, дигалогенированными ацетонитрилами, хлор- и бромбензолом, эфирами галоуксусной кислоты и метилфенилсульфоном (табл. 4).

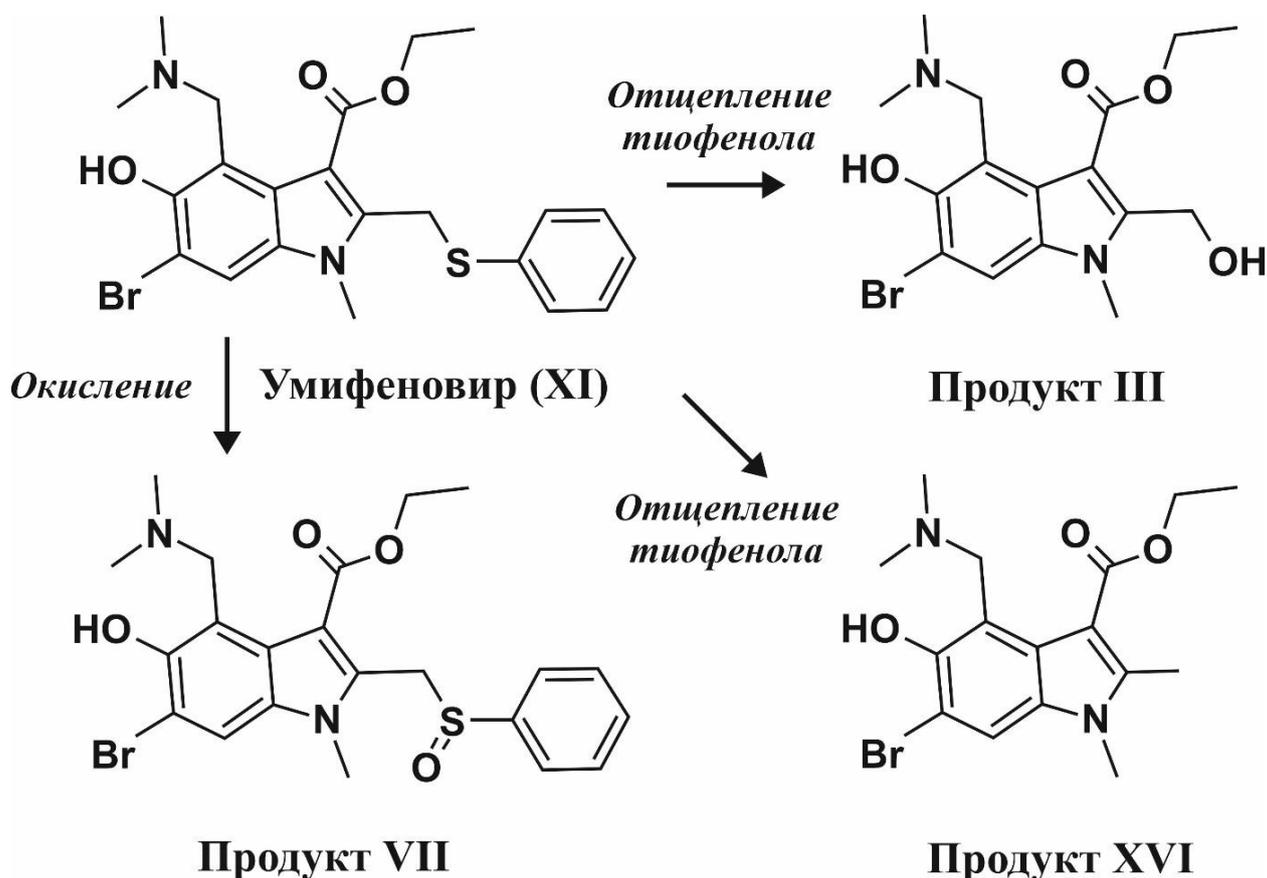


Рисунок 15 – Схема трансформации умифеновира при окислении растворенным кислородом воздуха

Большинство этих соединений являются классическими побочными продуктами дезинфекции [17]. Четыре доминирующих продукта представляли собой (в порядке убывания интенсивности сигнала на хроматограммах) трибромметан, этилдибромацетат, дибромхлорметан и этилхлорбромацетат. Высокие уровни полибромированных соединений свидетельствуют о том, что в образовании побочных продуктов дезинфекции на поздних стадиях реакции задействованы многочисленные механизмы с участием бромидин-ионов и гипобромит-анионов, образующихся за счет окисления бромидов гипохлоритом. Бромсодержащие соединения из этого списка не были обнаружены методом ВЭЖХ-ИСП-МС и, вероятно, элюировались с близким к фронту временем, одновременно с бромид-ионом. Для установления их вклада в интенсивность пика концентрация бромид-аниона в исследуемой реакционной смеси (рН 5, соотношение активный хлор/умифеновир 100 %)

определена методом ионной хроматографии и составила 1,8 мг/л, т.е. более половины всего количества брома, введенного в реакционную смесь с умифеновиром (3,3 мг/л).

Таблица 4. Времена удерживания, площади пиков, точные массы, элементный состав и предположительная идентификация продуктов глубокой деградации умифеновира, образующихся под действием избытка активного хлора

tr, мин	m/z	Элементный состав	Ошибка, м.д.	Площадь, у.е.	Идентификация
2,04	116,9061	CH <sub>3</sub> Cl	0,95	7,81	Трихлорметан
3,29	160,8555	CHBrCl <sub>2</sub>	0,31	18,0	Бромдихлорметан
3,66	108,9477	C <sub>2</sub> HCl <sub>2</sub> N	-2,87	1,19	Дихлорацетонитрил
4,91	205,8127	CHBr <sub>2</sub> Cl	-0,36	291	Дибромхлорметан
5,35	152,8977	C <sub>2</sub> HBrClN	0,73	4,31	Бромхлорацетонитрил
5,66	112,0075	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl	0,60	7,37	Хлорбензол
6,35	249,7623	CHBr <sub>3</sub>	0,19	1156	Трибромметан
6,63	-	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	5,63	Этилдихлорацетат
6,81	196,8471	C <sub>2</sub> HBr <sub>2</sub> N	0,40	6,25	Дибромацетонитрил
6,92	155,9571	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Br	0,94	0,182	Бромбензол
7,68	-	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> BrClO <sub>2</sub>	-	65,1	Этилхлорбромацетат
7,81	229,8572	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0,42	1,92	Метилдибромацетат
8,62	243,8730	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,30	212	Этилдибромацетат
10,59	156,0241	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> S	0,66	9,19	Метилфенилсульфон

\* - молекулярный ион отсутствует в масс-спектре

Это означает, что общая концентрация бромсодержащих органических продуктов глубокой деградации умифеновира не превышает 20 % от содержания бромид-аниона. Последний можно считать основным конечным бромсодержащим продуктом.

### 3.2 Изучение трансформации амброксола и бромгексина

Исследование модельных реакционных смесей бромгексина с активным хлором (гипохлоритом натрия) методом ВЭЖХ-ИЭР-МСВР позволило обнаружить не менее 21 побочного продукта дезинфекции (табл. 5), относящегося к классу азот содержащих побочных продуктов дезинфекции (N-ППД) [173]. На основе рассчитанных элементных составов и полученных тандемных масс-спектров предварительно идентифицированы химические

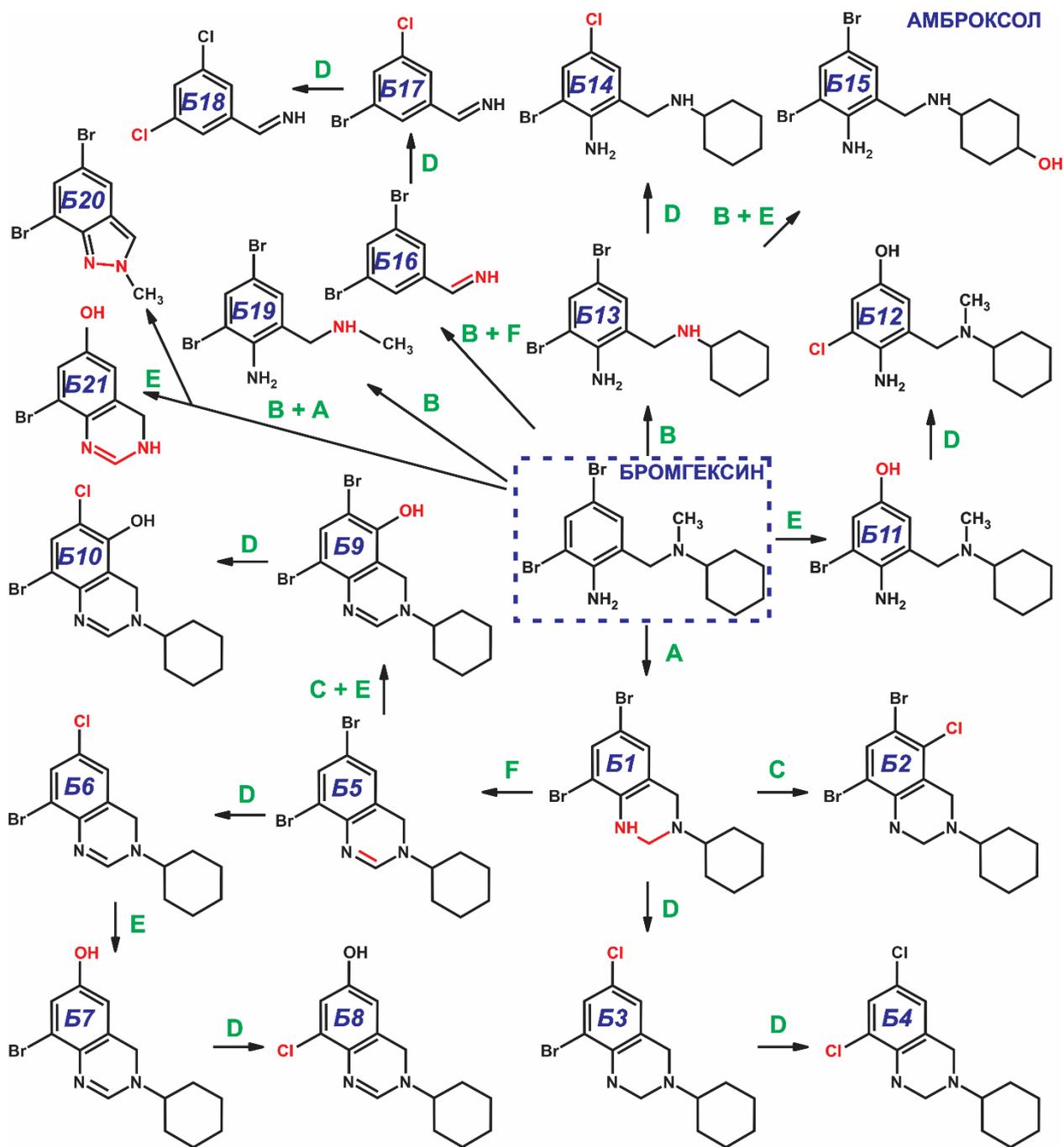
структуры каждого обнаруженного соединения и предложены пути их образования (рис. 16).

Одним из ключевых процессов, происходящих при трансформации бромгексина, является циклизация, обусловленная образованием ковалентной связи между ароматической аминогруппой и метильным заместителем в третичном аминогруппе. В результате образуется продукт Б1, имеющий в своей структуре дополнительный тетрагидропиримидиновый цикл. Это соединение уже известно в ряде литературных источников [60–61] как метаболит бромгексина, образующийся у животных и человека. Механизм циклизации может включать электрофильное замещение атома водорода в ароматической группе  $\text{NH}_2$  на хлор и дальнейшее взаимодействие образующегося хлораминного фрагмента с реакционноспособной метильной группой алифатического третичного амина, сопровождающееся отщеплением  $\text{HCl}$  и образованием связи  $\text{C-N}$ . Реакции способствует образование энергетически выгодного шестичленного кольца. Независимо от механизма циклизации продукт Б1 является важным интермедиатом в образовании как минимум половины обнаруженных N-ППД. Так, дальнейшие его превращения заключаются во внедрении атома хлора в ароматическое кольцо (хлорирование, продукт Б2) и замещении одного или двух атомов брома на хлор (продукты Б3 и Б4, соответственно). Как недавно было показано [170], последний процесс протекает по механизму электрофильного ипсо-замещения, чему способствует наличие заместителей с высокой электронодонорной способностью ( $-\text{NH}_2$  и  $-\text{OH}$ ) и приводит к отщеплению катиона брома. Являясь высокореакционной формой,  $\text{Br}^+$  может атаковать различные органические субстраты, имеющиеся в растворе, способствуя дальнейшему увеличению количества бромсодержащих побочных продуктов дезинфекции ( $\text{Br}$ -ППД). В частности, этим объясняется образование таких соединений, как 2,4,6-триброманилин, который был обнаружен среди продуктов деградации бромгексина в исследовании [62] и в настоящей работе.

Таблица 5. Времена удерживания, элементный состав,  $m/z$  ионов-предшественников и основных ионов-продуктов, продуктов трансформации бромгексина, обнаруженных методом ВЭЖХ-ИЭР-МСВР

Продукт	$t_R$ , мин	Элементный состав	$m/z$	Ошибка, м.д.	$m/z$ основных ионов-продуктов (относительная интенсивность, %)
Бромгексин	10,3	$C_{14}H_{20}Br_2N_2$	375,0067	0,3	261,8868 (100%); 292,8934 (43%); 263,8842 (28%)
Б1	9,8	$C_{14}H_{18}Br_2N_2$	372,9910	-0,9	261,8868 (100%); 112,1131 (12%); 182,9677 (8%)
Б2	13,7	$C_{14}H_{17}Br_2ClN_2$	406,9525	2,0	324,8740 (100%); 283,8472 (13%); 293,8312 (7%)
Б3	9,6	$C_{14}H_{18}BrClN_2$	329,0411	-1,1	217,9374 (100%); 112,1135 (13%); 246,9638 (4%)
Б4	9,2	$C_{14}H_{18}Cl_2N_2$	285,0911	-3,4	173,9874 (100%); 112,1130 (24%); 203,0139 (4%)
Б5	9,2	$C_{14}H_{16}Br_2N_2$	370,9745	-1,6	274,8945 (14%); 328,9291 (8%); 194,9676 (7%)
Б6	8,9	$C_{14}H_{16}Br_2N_2$	327,0250	-2,5	230,9441 (19%); 284,9787 (12%); 151,0185 (3%)
Б7	8,2	$C_{14}H_{17}BrN_2O$	309,0591	-1,9	226,9814 (100%); 148,0633 (23%); 211,9575 (5%)
Б8	9,1	$C_{14}H_{17}ClN_2O$	265,1093	-3,1	183,0322 (100%); 148,0636 (15%); 168,0086 (5%)
Б9	8,7	$C_{14}H_{16}Br_2N_2O$	386,9694	-2,1	311,9011 (9%); 337,9181 (3%); 110,0974 (3%)
Б10	8,5	$C_{14}H_{16}BrClN_2O$	343,0207	-1,0	260,9426 (100%); 182,0239 (33%); 181,0159 (10%)
Б11	6,6	$C_{14}H_{21}BrN_2O$	313,0903	-2,2	199,9711 (100%); 114,1287 (15%); 171,9711 (4%)
Б12	6,2	$C_{14}H_{21}ClN_2O$	269,1418	1,0	156,0208 (100%); 114,1283 (50%); 128,0255 (8%)
Б13	10,2	$C_{13}H_{18}Br_2N_2$	360,9898	-3,5	261,8860 (100%); 182,9675 (8%); 104,0504 (2%)
Б14	9,8	$C_{13}H_{18}BrClN_2$	317,0405	-2,7	217,9366 (100%); 139,0185 (5%)
Б15 (Амброксол)	7,2	$C_{13}H_{18}Br_2N_2O$	376,9860	1,4	261,8874 (100%); 182,9678 (6%)
Б16	6,1	$C_7H_5Br_2N$	261,8849	-3,2	182,9662 (35%); 181,9584 (19%); 155,9565 (15%)
Б17	6,4	$C_7H_5BrClN$	217,9367	-0,8	104,0512 (30%); 139,0184 (22%); 138,0118 (17%)
Б18	9,2	$C_7H_5Cl_2N$	173,9870	-0,5	-*
Б19	6,8	$C_8H_{10}Br_2N_2$	292,9273	-3,2	261,8863 (100%); 263,8842 (25%); 182,9677 (16%); 194,9674 (10%)
Б20	15,7	$C_8H_6Br_2N_2$	288,8967	1,2	209,9786 (100%); 208,9712 (70%); 273,8735 (5%)
Б21	9,2	$C_8H_7BrN_2O$	226,9815	-0,2	148,0615 (100%); 147,0552 (65%); 211,9584 (50%)

\* - Низкая интенсивность сигнала иона-предшественника



A - Циклизация; B - Деалкилирование; C - Хлорирование; D - Замещение; E - Гидроксилирование; F - Другие

Рисунок 16 – Схема трансформации бромгексина

Альтернативно,  $\text{Br}^+$  может быть дополнительно окислен до бромат-анионов ( $\text{BrO}_3^-$ ) [175], обладающих выраженными канцерогенными свойствами.

Результатом электрофильной атаки активного хлора на ароматическую вторичную аминогруппу в Б1 является образование двойной связи ( $\text{N}=\text{C}$ ) в

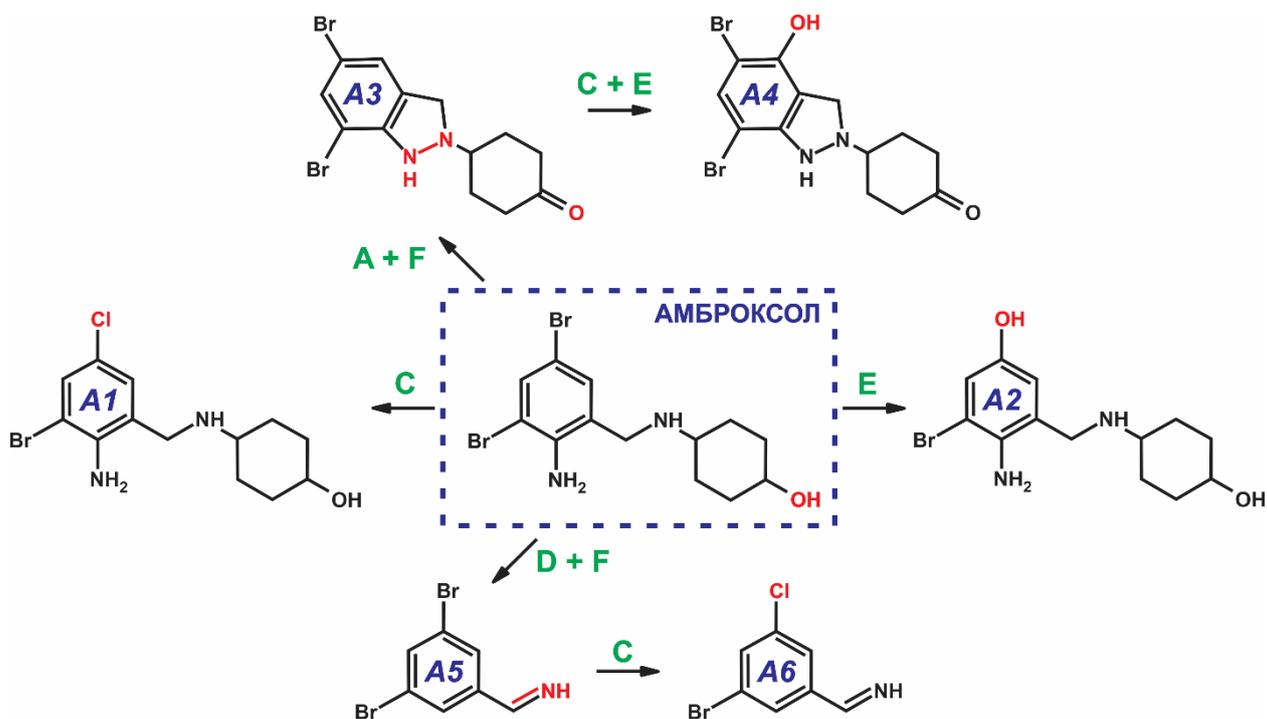
тетрагидропиримидиновом цикле (продукт Б5). Очевидно, эта реакция протекает через образование нестабильного хлорамина и последующее отщепление HCl. Этот процесс энергетически выгоден за счет увеличения системы сопряжения и протекает достаточно легко, давая широкий спектр первичных продуктов с двойной связью (продукты Б6-Б10 и Б21), образующихся преимущественно в результате превращений Б5. Как и в случае с Б1, они включают ипсо-замещение Br на Cl (продукты Б6, Б8 и Б10) и гидроксильное замещение, приводящее к замене атома брома или хлора на гидроксильную группу (продукты Б7 и Б9). Поскольку нуклеофильное замещение не может легко происходить в достаточно мягких условиях водного хлорирования, ключевую роль в механизме реакции могут играть радикальные процессы, особенно с участием гидроксильных радикалов, генерируемых в присутствии активного хлора. Исходная молекула бромгексина также способна к реакциям гидроксильного замещения (продукт Б11) и ипсо-замещения (продукт Б12), однако в этом случае были обнаружены только два промежуточных продукта.

Наряду с циклизацией важнейшим направлением трансформации бромгексина является N-деалкилирование. Возможность таких превращений в результате одноэлектронного переноса была подтверждена в недавней работе [175]. В случае бромгексина может происходить потеря метильных или циклогексильных заместителей, а также их одновременное отщепление. Деметилирование приводит к появлению интермедиата Б13, который в дальнейшем может претерпевать ипсо-замещение брома на хлор (продукт Б14) и гидроксильное замещение с образованием амброксола (продукт Б15) – известного метаболита бромгексина в живых организмах [60–61]. Утрата циклогексанового фрагмента, в свою очередь, сопровождается циклизацией с образованием нового шестичленного (связь C-N, продукт Б21) или пятичленного (связь N-N, продукт Б20) кольца. Кроме того, в реакции наблюдается также продукт деалкилирования бромгексина, не содержащий цикла (продукт Б19). Это подтверждает ключевую роль метильных и

аминогрупп бромгексина в образовании широкого спектра побочных продуктов дезинфекции. Как и в предыдущем случае, потеря двух алкильных заместителей сопровождается отщеплением группы  $-NH_2$ . Полученный интермедиат (продукт Б16) подвергается последовательному ипсо-замещению атомов брома на хлор (продукты Б17 и Б18).

В отличие от бромгексина, амброксол дает относительно узкий спектр продуктов первичного преобразования. По-видимому, это связано с отсутствием метильного заместителя у атома азота, играющего ключевую роль в реакциях циклизации. Всего в реакционной смеси методом ВЭЖХ-ИЭР-МСВР было обнаружено только шесть соединений различного элементного состава (табл. 6) [173]. В ряде случаев на хроматограмме наблюдались изомерные соединения с близкими временами удерживания. Скорее всего, это были позиционные изомеры (введение заместителей в разные положения ароматического кольца), поэтому в таблицу 6 вошли только доминирующие из них.

Как и в случае бромгексина, предложенная схема превращений амброксола (рис. 17) предполагает замену атома брома на хлор (хлорирование по механизму ипсо-замещения, продукт А1) или гидроксильную группу (радикальное гидроксирование, продукт А2). Последнее соединение уже известно как продукт водного фотолиза фармацевтического препарата [176], и этот факт можно рассматривать как дополнительное доказательство предполагаемого механизма радикального гидроксирования под действием активного хлора. Циклизация амброксола возможна только за счет образования пятичленного пиразолинового цикла со связью N–N. Этот процесс сопровождается окислением гидроксильной группы циклогексанового фрагмента до кетона (продукт А3). Это подтверждается наблюдаемым элиминированием CO в его тандемном масс-спектре. Дальнейшая трансформация А3 протекает преимущественно путем радикального гидроксирования и приводит к образованию А4.



**A** - Циклизация; **C** - Хлорирование; **D** - Замещение; **E** - Гидроксилирование; **F** - Другие

Рисунок 17 – Схема трансформации амброксола

Окислительное деалкилирование амброксола с отщеплением циклогексанового фрагмента приводит к образованию того же продукта, что и в случае с бромгексином (продукты A5 = B16). Впоследствии этот интермедиат подвергают ипсо-замещению брома хлором (продукты A6 = B17). Однако обнаруженный в экспериментах с бромгексином (продукт B18) продукт дальнейшего превращения с двумя хлорзаместителями в ароматическом кольце не удалось.

Как показано (рис. 16–17), первичные превращения бромгексина и амброксола протекают по разным путям и через образование ряда промежуточных продуктов [177]. Таким образом, их концентрации и соотношения в реакционных смесях могут существенно различаться в зависимости от времени реакции и дозировки активного хлора. В наших экспериментах площади хроматографических пиков исходных соединений и обнаруженных продуктов трансформации контролировали в течение 50 ч при двух уровнях активного хлора (4 и 7 мг/л), соответствующих ~2-кратному и ~4-кратному мольному избытку по отношению к субстратам, соответственно.

Таблица 6. Времена удерживания, элементный состав,  $m/z$  ионов-предшественников и основных ионов-продуктов, продуктов трансформации амброксола, обнаруженных методом ВЭЖХ-ИЭР-МСВР

Продукт	$t_R$ , мин	Элементный состав	$m/z$	Ошибка, м.д.	$m/z$ основных ионов-продуктов (относительная интенсивность, %)
Амброксол	7,2	$C_{13}H_{18}Br_2N_2O$	376,9866	2,0	261,8874 (100%); 182,9678 (6%)
A1	6,7	$C_{13}H_{18}BrClN_2O$	333,0364	-0,1	217,9364 (100%); 230,9931 (1%); 194,9721 (1%)
A2	3,0	$C_{13}H_{19}BrN_2O_2$	315,0701	0,4	199,9702 (100%); 171,9758 (4%)
A3	16,1	$C_{13}H_{14}Br_2N_2O$	372,9553	2,0	261,8850 (30%); 288,8955 (10%); 194,9669 (6%)
A4	16,2	$C_{13}H_{14}Br_2N_2O_2$	388,9495	0,6	290,8758 (100%); 211,9571 (12%); 370,9368 (1%)
A5	6,1	$C_7H_5Br_2N$	261,8860	-0,6	182,9670 (30%); 181,9594 (12%); 104,0503 (11%)
A6	5,5	$C_7H_5BrClN$	217,9363	-1,7	139,0183 (35%); 104,0503 (19%); 112,0060 (11%)

Полученные результаты (рис. 18–21) демонстрируют высокую реакционную способность обоих препаратов при взаимодействии с хлорирующим агентом – концентрации бромгексина и амброксола быстро снижаются в течение первых 5 мин, достигая значений, на порядок меньших исходных.

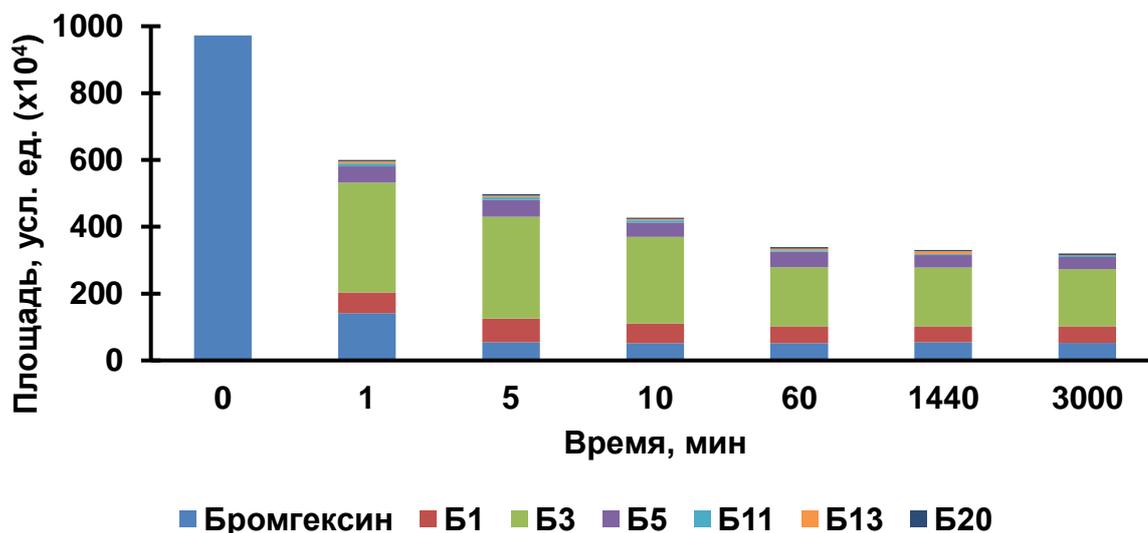


Рисунок 18. Площади хроматографических пиков бромгексина и продуктов трансформации при концентрации активного хлора 4 мг/л в зависимости от времени реакции

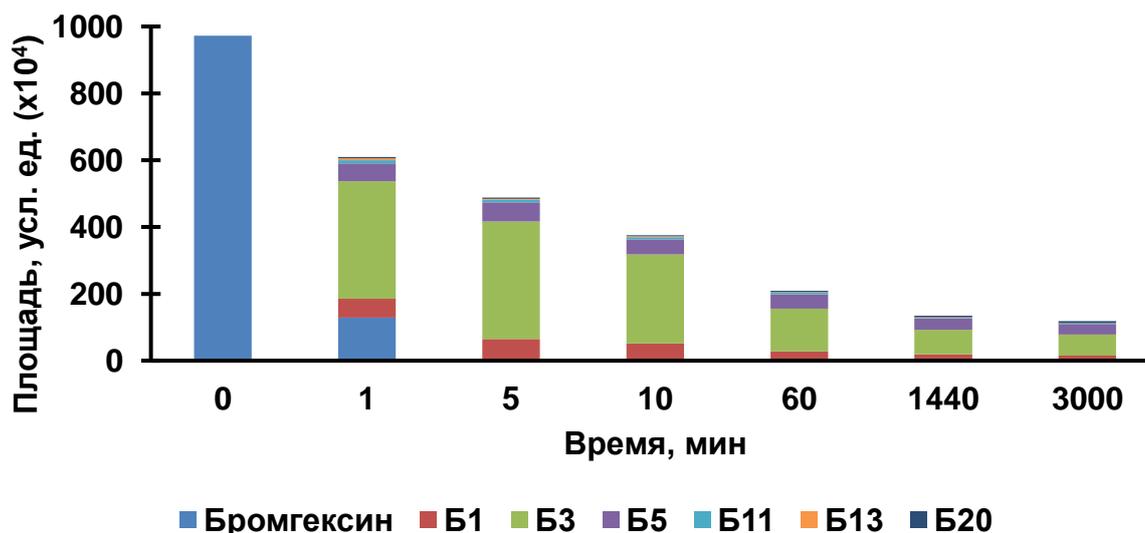


Рисунок 19. Площади хроматографических пиков бромгексина и продуктов трансформации при концентрации активного хлора 7 мг/л в зависимости от времени реакции

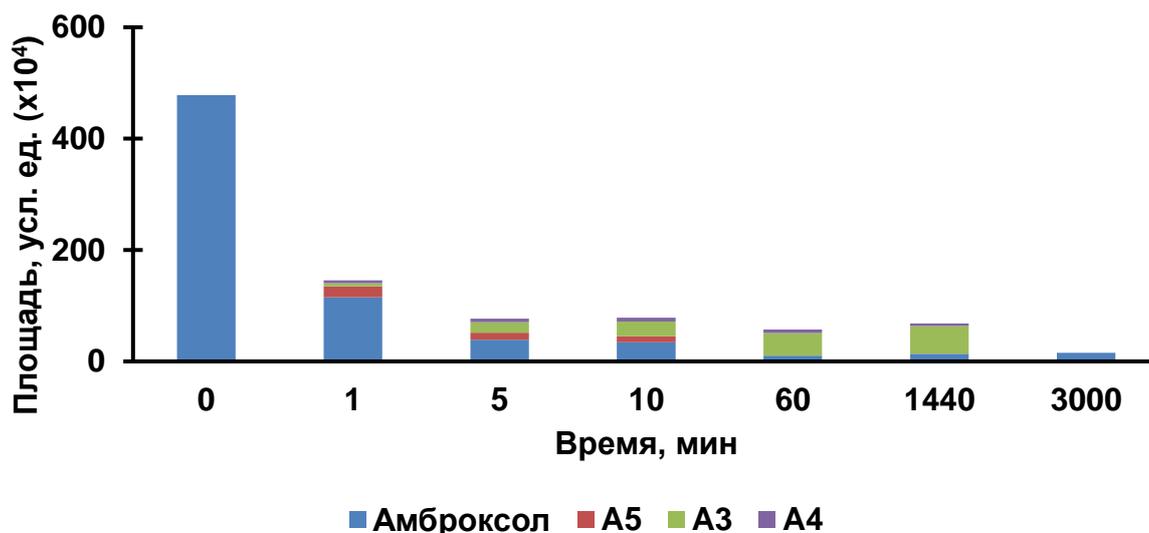


Рисунок 20. Площади хроматографических пиков амброксола и продуктов трансформации при концентрации активного хлора 4 мг/л в зависимости от времени реакции

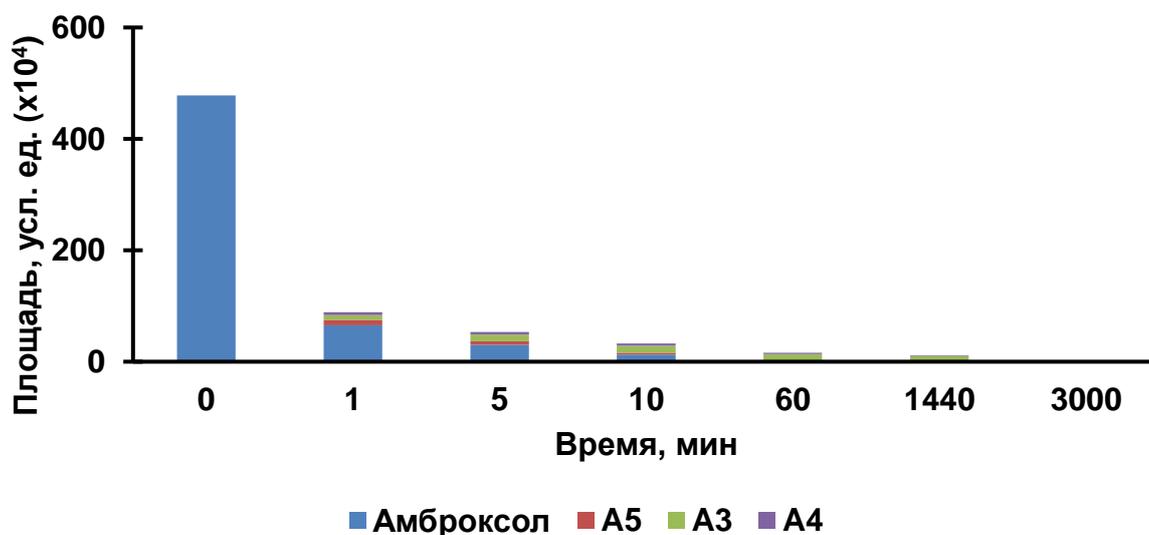


Рисунок 21. Площади хроматографических пиков амброксола и продуктов трансформации при концентрации активного хлора 7 мг/л в зависимости от времени реакции

Из-за более легкой циклизации бромгексин более восприимчив, чем амброксол, к действию активного хлора. Так, при наличии достаточного избытка хлора это соединение не обнаруживается с пятой минуты реакции, а остаточный амброксол обнаруживается даже в пробе, взятой через 1 ч после

добавления раствора гипохлорита. Более того, бромгексин отличается гораздо более высоким соотношением первичных продуктов разложения и исходного соединения. Первые представлены преимущественно продуктом циклизации Б1 и его производными Б3 и Б5. Концентрации всех этих первичных интермедиатов резко возрастают в начале реакции, достигая максимума в интервале 1-5 мин и затем постепенно снижаются за счет превращения в конечные продукты. Стоит отметить, что в реакционной смеси на протяжении всего изученного периода времени преобладает соединение Б3, являющееся продуктом замещения брома хлором. Этот факт указывает на легкость реакций ипсо-замещения в условиях водного хлорирования. Такая же картина наблюдается и при меньшей дозировке хлорирующего агента. Однако в этом случае концентрации всех представленных соединений остаются практически постоянными через 60 мин из-за отсутствия активного хлора.

Иная картина характерна для динамики трансформации амброксола. В отличие от бромгексина, это соединение при недостатке активного хлора быстро превращается в интермедиат А5 (отщепление циклогексанового фрагмента) и другие продукты глубокой деградации. При этом концентрация продукта циклизации А3 постепенно возрастает в течение 24 ч, что делает этот метаболит доминирующим среди первичных продуктов распада. Однако еще через 24 ч последние в реакционной смеси не были обнаружены. При избытке активного хлора такая закономерность сохраняется, но максимальная концентрация смещается ко времени реакции 10 мин.

Для выявления продуктов глубокой деградации бромгексина и амброксола были приготовлены реакционные смеси с избытком активного хлора по отношению к субстратам (10:1 по массе), растворы выдерживали в течение 30 мин до завершения реакции. Их анализ методом газовой хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения с твердофазной микроэкстракцией (ТФМЭ-ГХ-МСВР) позволил обнаружить двадцать четыре летучих и полуметучих ППД (табл. 7). Обнаруженные продукты представлены шестью классами соединений: тригалометаны, дигалогенацетонитрилы, сложные

эфиры галогенуксусных кислоты, галоанилины, галогенбензолы и галоиндазолы.

Как и ожидалось, основными продуктами глубокой деградации оказались тригалогенметаны, на долю которых приходится около 90% всех обнаруженных соединений (по соотношению площадей хроматографических пиков) и известные как конечные продукты хлорирования растворенного органического вещества. Их образование из амброксол и бромгексин при хлорировании воды уже было показано в работе [62]. Результаты настоящего исследования показывают, что в идентичных условиях и большом избытке активного хлора бромгексин и амброксол различаются лишь количеством только одного продукта этого класса. Несмотря на преобладание дибромхлорметана у обоих препаратов (>50% всех летучих ППД), для бромгексина характерно ускоренное образование бромдихлорметана (23% всех летучих ППД), тогда как амброксол дает вдвое меньше этого продукта.

В свою очередь амброксол образует в 6 раз больше дигалогенацетонитрилов, что также согласуется с данными [62]. Кроме того, содержание метиловых эфиров галогенуксусных кислот в продуктах деградации амброксола почти в 15 раз превышает содержание бромгексина. Следует отметить, что галоацетонитрилы и производные галоуксусных кислот также являются типичными продуктами глубокой деградации органических веществ при взаимодействии с активным хлором.

Полулетучими ППД, специфичными для изучаемых лекарственных средств, являются галогенанилины. В работе [62] впервые установили возможность образования 2,4,6-триброманилина и 2-хлор-4,6-диброманилина из бромгексина и амброксола. Однако наши результаты, полученные методом ТФМЭ-ГХ-МСВР, указывают на возможность формирования гораздо более широкого круга продуктов этого класса. Таким образом, в реакционных смесях были обнаружены и предварительно идентифицированы еще девять галогенанилинов.

Таблица 7. Продукты глубокой трансформации амброксола и бромгексина

Продукт	tr, сек	Элементный состав	Идентификация	% относительная площадь хроматографических пиков ППД	
				Бромгексин	Амброксол
1	176	CHCl <sub>3</sub>	Трихлорметан	2,5	3,7
2	267	CHBrCl <sub>2</sub>	Бромдихлорметан	22,6	10,7
3	381	CHBr <sub>2</sub> Cl	Дибромхлорметан	54,3	64,5
4	495	CHBr <sub>3</sub>	Трибромметан	12,0	12,4
5	283	C <sub>2</sub> HCl <sub>2</sub> N	Дихлорацетонитрил	0,1	0,3
6	407	C <sub>2</sub> HBrClN	Бромхлорацетонитрил	0,2	1,3
7	527	C <sub>2</sub> HBr <sub>2</sub> N	Дибромацетонитрил	0,1	0,8
8	442	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Метилловый эфир дихлоруксусной кислоты	0,03	0,1
9	539	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> BrClO <sub>2</sub>	Метилловый эфир бромхлоруксусной кислоты	0,1	1,1
10	627	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Метилловый эфир дибромуксусной кислоты	0,1	2,0
11	1000	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> N	2,4,6-Трихлоранилин	2,7	0,1
12	1073	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> BrCl <sub>2</sub> N	4-Бром-2,6-дихлоранилин	0,8	-
13	1077	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> BrCl <sub>2</sub> N	2-Бром-4,6-дихлоранилин	0,6	0,2
14	1144	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> ClN	2,6-Дибром-4-хлоранилин	0,2	0,01
15	1148	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> ClN	2,4-Дибром-6-хлоранилин	1,2	0,5
16	1713	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> ClNO	2,4-Дибром-6-хлор-2-аминобензальдегид	0,02	0,1
17	1217	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>3</sub> N	2,4,6-триброманилин	0,6	0,1
18	1123	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> BrClN	4-Бром-2-хлоранилин	0,1	0,3
19	1195	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Br <sub>2</sub> N	2,4-Диброманилин	1,3	0,1
20	1118	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> BrClNO	3-Бром-5-хлор-2-метоксианилин	0,2	0,8
21	1185	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Br <sub>2</sub> NO	2,6-Дибром-4-метоксианилин	-	0,5
22	933	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>2</sub> Cl	1,3-Дибром-5-хлорбензол	0,04	0,1
23	1318	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> BrClN <sub>2</sub>	5-Бром-7-хлор-2-метилиндазол	0,1	0,1
24	1383	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	5,7-Дибром-2-метилиндазол	0,1	0,3

Среди них преобладают продукты упомянутого выше ипсо-замещения брома на хлор, в том числе полностью замещенный 2,4,6-трихлоранилин, являющийся основным представителем галогенанилинов, ППД полученных из бромгексина. Особого внимания заслуживают галометоксианилины, два представителя которых обнаружены впервые. Их образование может быть обусловлено метилированием соответствующих гидроксированных соединений, предшественники которых выявлены методом ВЭЖХ-ИЭР-МСВР. В этом случае небольшие количества метанола, использованного в качестве растворителя для бромгексина и амброксола, могли действовать как метилирующий агент, а образовавшиеся продукты предпочтительно экстрагировались методом ТФМЭ из-за их более высокой летучести по сравнению с исходными гидроксированными ППД. Следует отметить, что трансформация бромгексина характеризуется трехкратным преобладанием галогенанилинов в реакционной смеси по сравнению с трансформацией амброксолом.

Более глубокая деградация галогенанилинов приводит к отщеплению аминогруппы и образованию галогенбензолов. Один представитель этого класса, 1,3-дибром-5-хлорбензол, родственной упомянутому выше 2,4-дибром-6-хлоранилину, впервые был обнаружен в следовых количествах как среди ППД бромгексина, так и амброксола.

Еще одна группа новых ППД, связанных с деградацией бромгексина и амброксола, представлена галогенированными индазолами. Их образование происходит путем деалкилирования продуктов первичного превращения, содержащих в своей структуре пиразолиновый или тетрагидропиримидиновый цикл. Хотя в небольших количествах обнаружены только два таких соединения (5-бром-7-хлор-2-метилиндазол и 5,7-дибром-2-метилиндазол), их открытие представляет интерес ввиду высокой реакционной способности связи N-N и однозначно подтверждает возникновение процессов циклизации на начальных стадиях хлорирования вод.

### **3.3 Оценка содержания умифеновира, амброксола, бромгексина и побочных продуктов их дезинфекции в объектах окружающей среды**

Предварительная оценка содержания фармацевтических препаратов и продуктов их трансформации проведена в реальных образцах, отобранных на очистных сооружениях канализации города в 2021 г. [178–179]. Для решения задачи концентрирования водных образцов нами использован подход, основанный на твердофазной экстракции аналитов (ТФЭ). В случае анализа осадков сточных вод, активного ила и донных отложений – ультразвуковая экстракция (УЗЭ). Применены аналогичные методике ЕРА 1694 условия проведения экстракции [77].

Сочетание методов ВЭЖХ-ИЭР-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС (по отношению к бромсодержащим соединениям) позволило обнаружить и надежно подтвердить наличие умифеновира, а также трех продуктов его трансформации (III, VI, VII). Которые были идентифицированы в модельных экспериментах по взаимодействию противовирусного препарата с активным хлором. Не смотря на сложный химический состав и высокое содержание органического вещества, заметных вмешательств со стороны матрицы не наблюдалось. Остальные продукты трансформации умифеновира, амброксол, бромгексин и побочные продукты их дезинфекции обнаружены не были. Результаты анализов проб активного ила (АИ), донных отложений (ДО), поступающих (СВ-1) и сбрасываемых сточных (СВ-2) и речных вод (РВ) приведены в таблице 8.

Муниципальные сточные воды, поступающие на очистные сооружения г. Архангельска в марте 2021 г. (СВ-1), содержали около 0,8 мкг/л умифеновира и в 10 раз меньший уровень (0,07 мкг/л) первичного продукта его трансформации VII. Кроме того, в следовых количествах обнаружен второй по значимости продукт трансформации III. Эти уровни соответствуют ежедневному поступлению в канализацию около 70 г противовирусного

препарата и хорошо согласуются с количеством зарегистрированных новых случаев COVID-19 за период отбора проб (~30 человек/сутки).

Таблица 8. Оценка содержания умифеновира и его побочных продуктов дезинфекции в объектах окружающей среды (март 2021 г.)

Соединение	Содержание, мкг/кг		Концентрация, нг/л		
	АИ	ДО	СВ-1	СВ-2	РВ
Продукт III	1,3	0,027	8	6	-
Продукт VI	13	-	-	-	-
Продукт VII	270	0,53	65	52	-
Умифеновир	1260	3,2	780	460	13

\* - ниже предела обнаружения

Следует отметить, что на пике заболеваемости в декабре 2020 года количество заболевших превышало 200 человек/сутки и, соответственно, количество умифеновира, попадающего в сточные воды, также было значительно выше. Исследование очищенных сточных вод (проба СВ-2) показало, что использованная технология очистки удалила примерно 40 % поступающего умифеновира. Степень удаления его метаболитов не превышала 20–25 %, так как они перманентно образуются при трансформации противовирусного препарата. Резкое падение уровня загрязнения происходит в природном водоеме – в 2 км ниже по течению от места сброса очищенных сточных вод (проба РВ). Концентрация умифеновира была резко ниже (в 35 раз), а продукты его трансформации не обнаружены. Такой результат можно объяснить как значительным разбавлением сточных вод, так и возможностью связывания и трансформации препарата в природных водных экосистемах. Наибольший интерес представляют результаты исследования проб биологического ила и донных отложений. Как уже указывалось во введении, содержание умифеновира в пробе АИ было чрезвычайно высоким (1,3 мг/кг), что более чем на 3 порядка превышало его концентрацию в воде, контактирующей с илом. Этот вопрос свидетельствует о высокой сорбционной способности биологического ила по отношению к противовирусному препарату и возможности накопления последнего с

достижением весьма небезопасных уровней. Важным следствием такого накопления является проблема утилизации шлама – практика размещения его на свалке чревата выщелачиванием умифеновира в подземные воды и вторичным загрязнением водоемов. Кроме умифеновира, в осадке в большом количестве (20 % относительно умифеновира) обнаружено его сульфоксидное производное VII, а также продукт деградации III, содержание которого было на 2 порядка ниже. В отличие от проб воды продукт VI, образующийся при деметилировании соединения VII, также обнаружен в пробе АИ в значительном количестве (13 мкг/кг). Очень высокое содержание умифеновира (3,2 мкг/кг) обнаружено в донных отложениях р. Хаторица (проба ДО). Хотя уровни препарата и его основных производных III и VII были на 2–3 порядка ниже, чем в пробе АИ, загрязнение донных отложений соединением с высокой биологической активностью может оказать негативное влияние на донную фауну, а также создать вторичный источник загрязнения речных вод.

В связи с обнаружением высокого содержания умифеновира и его продуктов трансформации, возникает необходимость контролировать данные соединения в объектах окружающей среды. Для этого необходимо разрабатывать новые способы определения, фармацевтического препарата и его метаболитов в сточной воде и объектах окружающей среды на следовом уровне концентраций.

#### **3.4 Разработка методики определения умифеновира и его метаболитов**

Эксперименты по предварительному скринингу объектов окружающей среды, показали присутствие в них исходного умифеновира и трех продуктов трансформации, идентифицированных ранее при модельном хлорировании [166] (рис. 22).

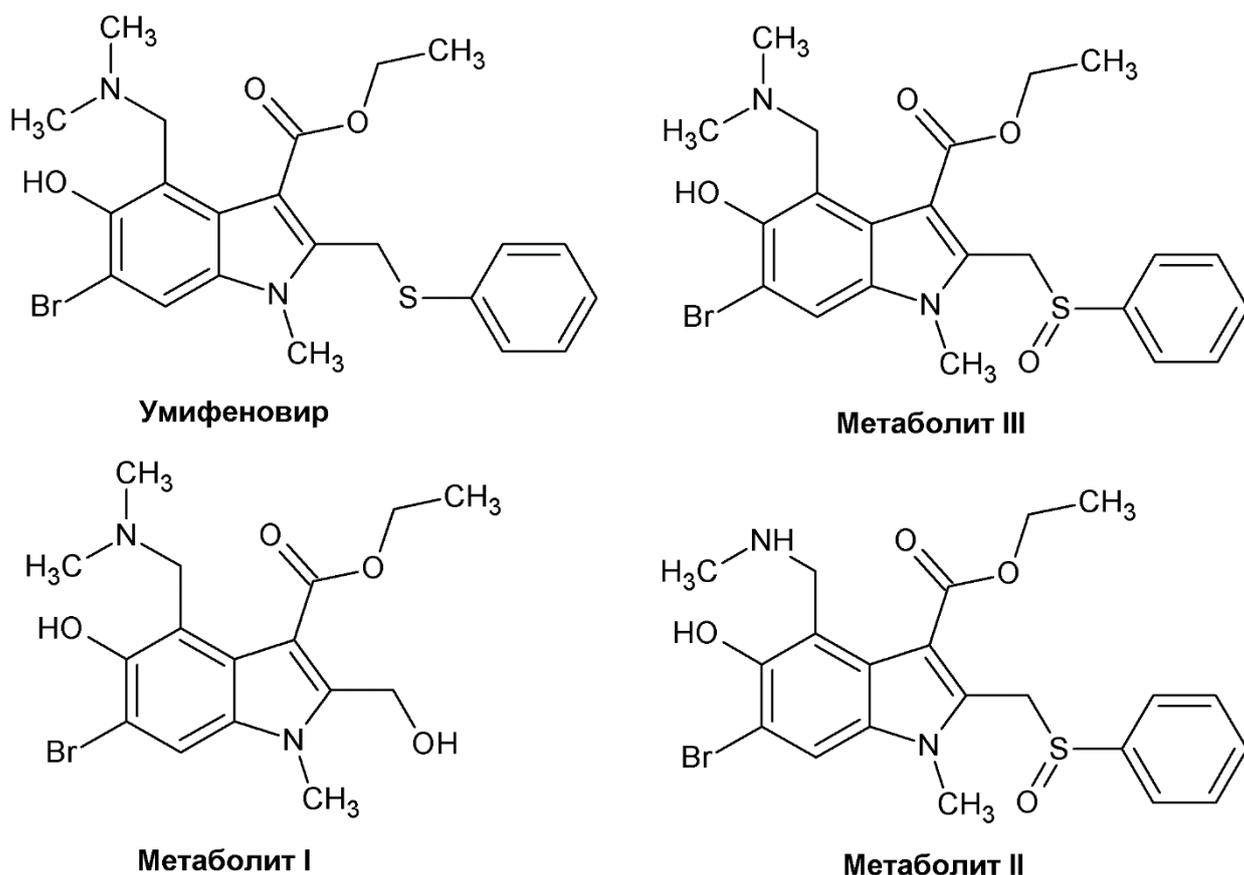


Рисунок 22 – Структурные формулы умифеновира и важнейших его метаболитов.

Указанные соединения выбраны нами в качестве целевых аналитов для контроля уровней загрязнения муниципальных сточных вод и природных водных объектов, находящихся под их воздействием. Характеристики четырех соединений, необходимые для поиска и надежной идентификации аналитов в реальных образцах сточной воды и донных отложений, определяли методом ИЭР-МСВР (табл. 9). Ввиду отсутствия стандартных образцов метаболитов умифеновира, а также крайней сложности исследуемых матриц, содержащих тысячи посторонних соединений, возможности для проведения количественного анализа методами жидкостной хроматомасс-спектрометрии существенно ограничены. Это в значительной степени относится и к исходному умифеновиру, поскольку надежное элиминирование матричных эффектов при использовании масс-спектрометрического детектирования с

ионизацией электрораспылением возможно лишь при наличии труднодоступных изотопно-меченых стандартов аналита.

Таблица 9. Характеристики аналитов, применяемые для идентификации при детектировании в режиме масс-спектрометрии высокого разрешения.

Аналит	Элементный состав	m/z	Ошибка, млн <sup>-1</sup>	m/z ионов-продуктов (отн. интенсивность, %)
Метаболит I	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	385,0767	2,5	293,9763 (95); 295,9911 (100); 340,0188 (60); 385,0769 (15)
Метаболит II	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	479,0651	3,1	278,9887 (60); 293,9760 (30); 323,0157 (100); 354,0581 (25)
Метаболит III	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	493,0807	3,2	278,9874 (50); 293,9750 (25); 323,0144 (100); 368,0727 (60)
Умифеновир	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	477,0856	2,9	278,9888 (80); 293,9763 (70); 323,0155 (35); 432,0279 (100)

Тем не менее, благодаря наличию в структуре всех целевых аналитов атома брома, решением проблемы их надежного количественного определения является применение масс-спектрометрического детектирования, селективного по отношению к бромю. Таким методом является масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой, которая в сочетании с хроматографическим разделением обеспечивает отдельное определение бромсодержащих соединений при совместном присутствии. В таком варианте градуировка системы может быть реализована с использованием любых бромсодержащих внешних стандартов. Для максимального учета возможных интерференций в аргоновой плазме, требованием к таким стандартам является близкое к аналитам удерживание на выбранной неподвижной фазе. В случае выбранных нами целевых аналитов, таким стандартом может выступать сам умифеновир.

В качестве неподвижной фазы для хроматографического разделения выбран пентафторфенильный сорбент на основе силикагеля, обеспечивающий хорошее удерживание аналитов, а также отделение от полярных компонентов матрицы (в том числе бромид-ионов), элюирующихся с фронтом. Проведенная оптимизация параметров хроматографического разделения была ориентирована на обеспечение полного разделения пиков аналитов,

минимизацию времени анализа с целью сокращения потребления аргона и снижения себестоимости, а также устранение мешающих влияний при ионизации в условиях ИСП-МС. Сравнение ацетонитрила и метанола в качестве органических модификаторов подвижной фазы показало несомненное преимущество последнего. В отличие от ацетонитрила, в условиях анализа метанол не дает существенных отложений углерода на входном конусе масс-спектрометра и обеспечивает высокую стабильность плазмы в течение длительного времени независимо от доли органического растворителя в подвижной фазе. В результате оптимизации выбрана следующая программа градиентного элюирования: 0–1 мин: 25 % метанола, 1–20 мин: линейное повышение доли спирта до 100 %, 20–30 мин: 100 % метанола. Для снижения интенсивности образования нагара после элюирования всех компонентов с хроматографической колонки (16 мин) поток элюента автоматически перенаправляется в слив, минуя ионный источник масс-спектрометра.

В качестве аналитического иона выбран  $^{79}\text{Br}$  ( $m/z$  79) поскольку использование изотопа  $^{81}\text{Br}$  оказалось затруднительным вследствие существенно более высокого уровня полиатомных интерференций со стороны реальных проб, подвижной фазы и компонентов плазмы, в том числе за счет образование кластеров  $^{40}\text{Ar}^2\text{H}^+$  [180]. Регистрация хроматограмм по иону с  $m/z$  79 также показывает наличие интерференций со стороны кластеров аргона ( $^{38}\text{Ar}^{40}\text{ArH}^+$  и  $^{39}\text{K}^{40}\text{Ar}^+$ ), при этом наблюдается значительный дрейф базовой линии при увеличении доли метанола в элюенте. Для устранения данного эффекта использовался коллизионно-реакционный интерфейс масс-спектрометра с подачей водорода и гелия в качестве реакционных газов (рис. 23). Ожидаемо наилучшие результаты были достигнуты при использовании водорода благодаря его способности к селективному взаимодействию с аргоном в плазме, оптимальный расход газа-реагента при этом составил 40 мл/мин. Применение КРИ позволило не только

минимизировать полиатомные интерференции, но и повысить соотношение сигнал/шум более чем в 3 раза.

В целях определения возможности использования единого аналитического стандарта для градуировки системы ВЭЖХ-ИСП-МС, был проведен анализ смесей амброксола, бромгексина и умифеновира с различными концентрациями. Установлено, что несмотря на разное время удерживания препаратов, аналитический отклик системы к ионам брома на протяжении всего хроматографирования стабилен, в связи с чем сделан вывод, что для её градуировки может быть использовано одно из используемых бромсодержащих соединений, например умифеновир. А расчёт концентрации любого другого обнаруженного соединения может быть выполнен по формуле, основанной на чувствительности масс-спектрометрической системы к брому и массовой доли брома в соединении (которые могут быть установлены методом МСВР):

$$x = \frac{y \times M(C_l H_m Br_n \dots)}{a_{Br} \times M(Br_n)},$$

где  $y$  – площадь хроматографического пика;  $M(C_l H_m Br_n \dots)$  – молекулярная масса соединения;  $a_{Br}$  – коэффициент чувствительности ИСП–МС к иону  $^{79}\text{Br}$  или  $^{81}\text{Br}$ ;  $M(Br_n) = n \times 79,904$  а.е.м.

Анализ стандартных растворов умифеновира в широком диапазоне концентраций позволил определить инструментальные пределы обнаружения (ПО) и нижние пределы определяемых концентраций (НПОК) на основании критериев  $3\sigma$  и  $10\sigma$  (соотношение сигнал/шум), а также линейные диапазоны концентраций аналитов. Градуировочные зависимости, полученные с использованием стандартного образца умифеновира линейны в широком диапазоне концентраций (не менее 4 порядков) с коэффициентов корреляции  $R^2$  более 0,99.

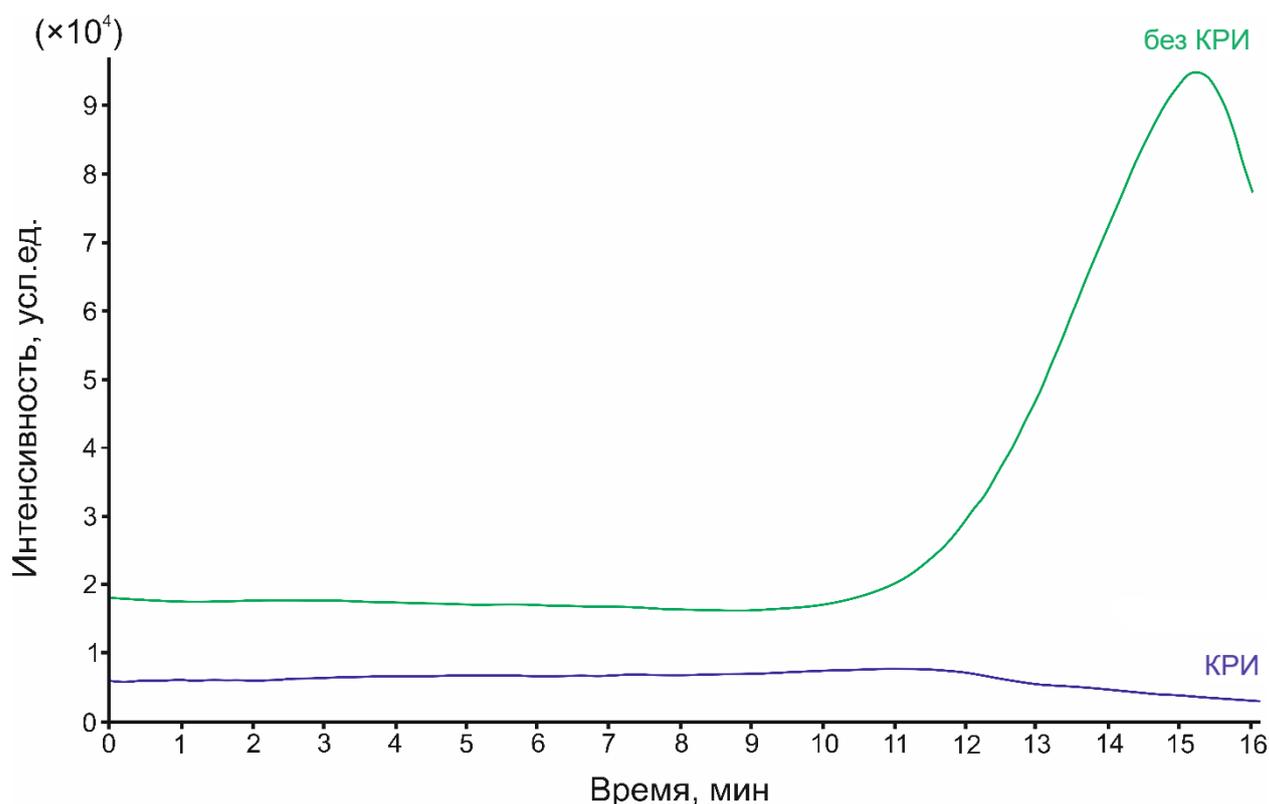


Рисунок 23 – Хроматограммы деионизованной воды в режиме градиентной ВЭЖХ-ИСП-МС без (сверху) и с (снизу) применением коллизионно-реакционного интерфейса (КРИ)

Достигнутая чувствительность ВЭЖХ-ИСП-МС анализа находится на уровне единиц мкг/л без предварительного концентрирования исследуемых образцов и обеспечивает решение практических задач, находясь на уровне, близком к достигаемому в методе ВЭЖХ-ИЭР-МСВР. Это обеспечивает эффективное совместное применение обеих техник для поиска и идентификации аналитов (ВЭЖХ-ИЭР-МСВР) и селективного количественного определения (ВЭЖХ-ИСП-МС). Расчет концентраций метаболитов умифеновира при этом производится по концентрации брома с использованием пересчетных коэффициентов (табл. 10), учитывающих молекулярные массы аналитов.

Таблица 10. Метрологическая характеристика подхода к определению умифеновира и его метаболитов методом ВЭЖХ-ИСП-МС

Аналит	$t_R$ , мин	Коэффициент $a_{Br} \times 10^4$ уравнения вида $y = a \cdot x$ (градуировка по бром)	Коэффициент $a \times 10^4$ уравнения вида $y = a \cdot x$ (градуировка по умифеновиру)	ПО, мкг/л (по бром)	ПО, мкг/л	Линейный диапазон (по бром), мкг/л
Метаболит I	6,2	5,76	1,21	0,4	1,5	НПОК - 10000
Метаболит II	8,7		1,03		1,8	
Метаболит III	8,9		0,92		2,1	
Умифеновир	11,8		0,98		2,0	

Необходимо отметить, что такой комбинированный метод анализа может быть использован для поиска и количественного определения самых разных бромсодержащих соединений, элементный состав которых может быть установлен на основании точных масс по данным ВЭЖХ-ИЭР-МСВР [181].

Оптимизация условий пробоподготовки образцов. Определение умифеновира и его метаболитов в реальных образцах природных и сточных вод, а также донных отложений, требует предварительной подготовки образцов к анализу, включая их концентрирование, а также удаление компонентов матрицы [182]. Для решения задачи концентрирования водных образцов нами использован подход, основанный на твердофазной экстракции аналитов с применением полимерного функционализированного сорбента BondElute PPL, обладающего сродством как к неполярным, так и умеренно полярным аналитам [77].

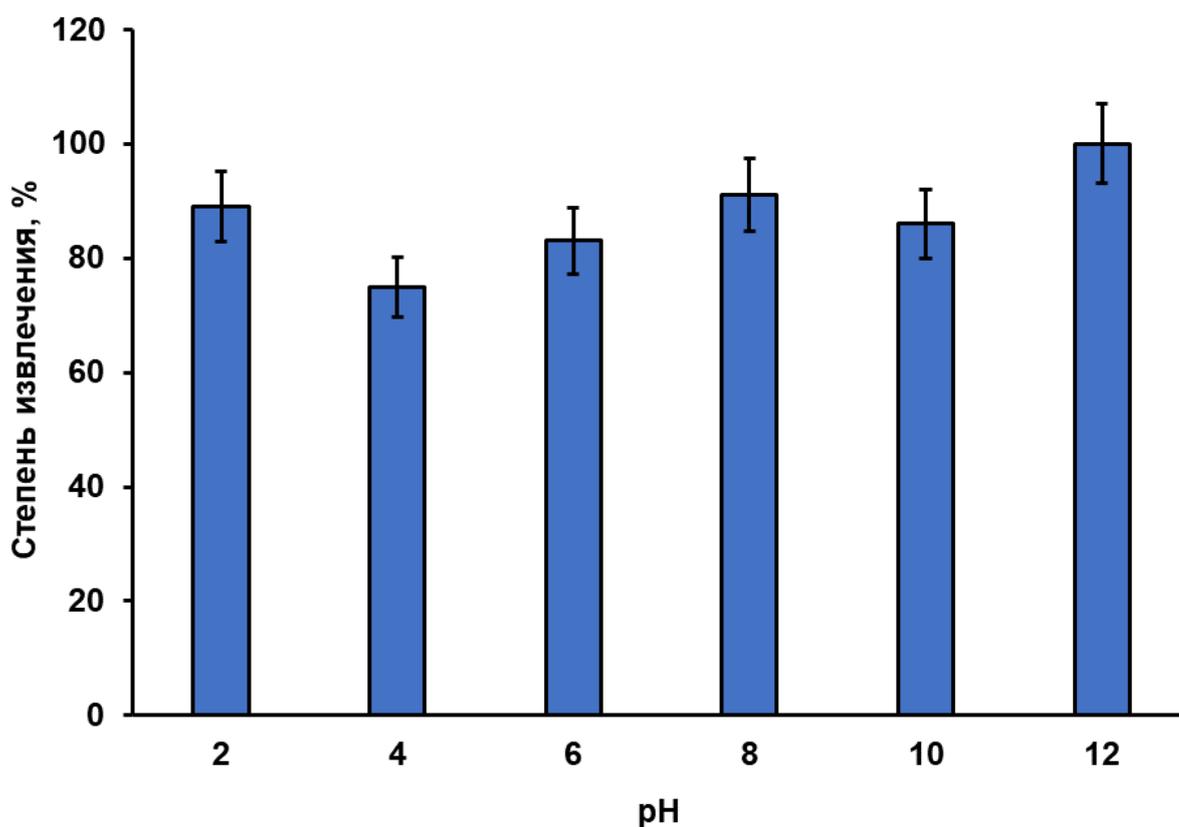


Рисунок 24 – Степень извлечения умифеновира в зависимости от величины pH водного образца при твердофазной экстракции

Параметры проведения твердофазной экстракции (рН и состав элюента) оптимизировали на модельных растворах, содержащих 0,5 мкг/л умифеновира. Величину рН варьировали в диапазоне от 2 до 12 (шаг 2). Представленные на рисунке 24 данные демонстрируют, что во всем исследуемом диапазоне рН степень извлечения находится на уровне не менее 75 %, при этом среднеквадратичное отклонение полученных величин не превышает 7 %. Тем не менее, максимальные значения степени извлечения достигаются в щелочной среде (рН 12) вследствие перевода аналита в молекулярную форму за счет депротонирования третичной аминной группы в его структуре.

Значительное влияние на эффективность ТФЭ может оказывать природа растворителя, применяемого для элюирования аналитов с сорбента. Предварительные эксперименты показали, что применение чистого ацетонитрила или метанола не позволяет эффективно десорбировать умифеновир – получаемые степени извлечения не превышают 1 %. Данная проблема была решена путем перевода аналита в протонированную форму за счет добавления в элюент 0,5 % (об.) муравьиной кислоты, что повышает эффективность элюирования до  $100 \pm 6$  % и  $84 \pm 4$  % для метанола и ацетонитрила, соответственно). Таким образом, с учетом чувствительности метода ВЭЖХ-ИСП-МС и степени концентрирования в ходе пробоподготовки ( $\times 2000$ ) достигаемый предел обнаружения и нижние границы определяемых концентраций в пересчете на бром составляют 0,2 и 0,7 нг/л, соответственно.

В случае анализа осадков сточных вод, активного ила и донных отложений для извлечения аналитов разработан подход, основанный на применении жидкостной экстракции под давлением. Изучена возможность применения в качестве экстрагентов ацетонитрила и метанола, в том числе с добавками кислоты и щелочи: I – ацетонитрил с 1 % муравьиной кислоты, II – ацетонитрил, III – ацетонитрил с 1 % аммиака, IV – метанол с 1 % муравьиной кислоты, V – метанол, VI – метанол с 1 % аммиака. При проведении процедуры экстракции при 100 °С ни один из вариантов с

метанолом (IV–VI) не позволяет достичь степени извлечения более 30 % (рис. 25).

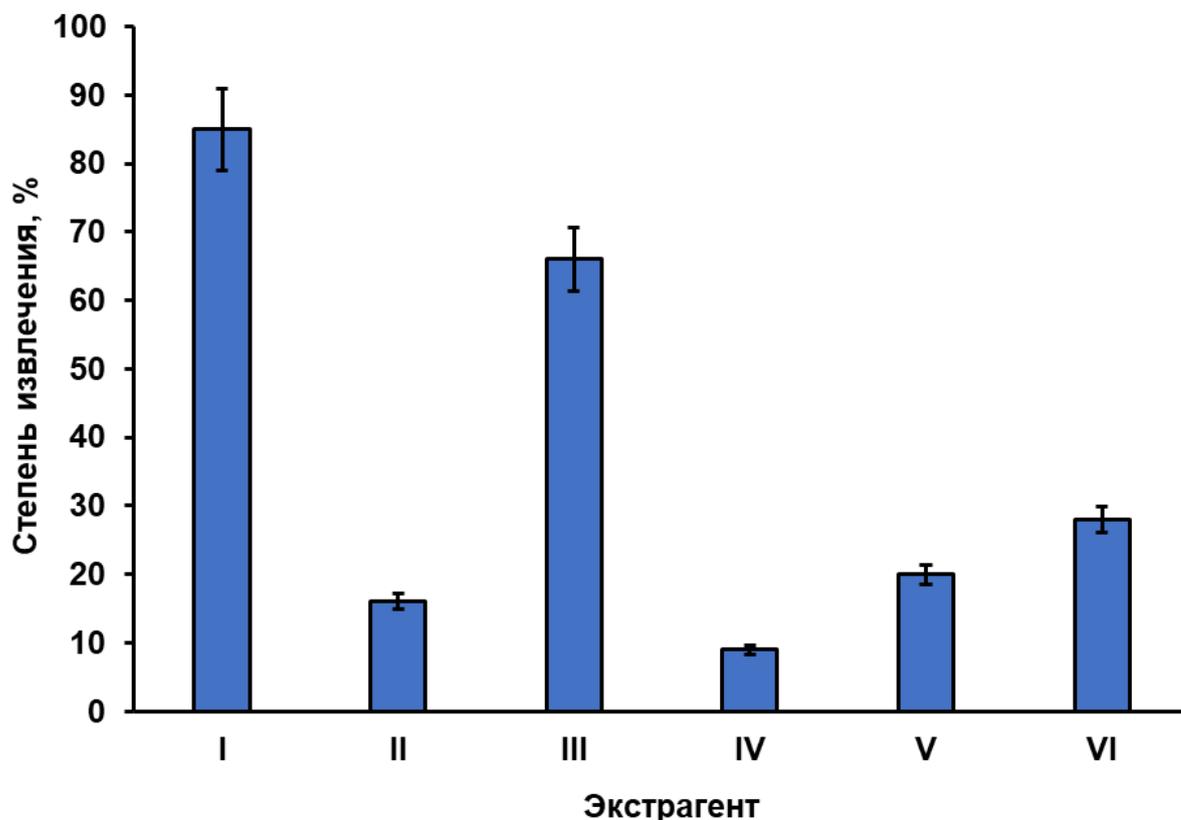


Рисунок 25 – Степень извлечения умифеновира в зависимости от типа применяемого органического экстрагента при экстракции донных отложений методом жидкостной экстракции под давлением

Это может быть обусловлено протеканием побочных процессов алкоголиза сложноэфирной связи, а также метилированием фенольной гидроксильной группы при повышенных температуре и давлении. Чистый ацетонитрил (II) также характеризуется крайне низкой эффективностью – извлечение находится на уровне 15–20 %. Как и в случае элюирования с полимерного сорбента для ТФЭ, перевод аналита в протонированную форму путем добавки в экстрагент кислоты позволяет достичь максимальных величин степени экстракции, которые составили  $85 \pm 4$  %. Увеличение температуры экстракции не привело к повышению эффективности извлечения. Наоборот, при достижении температуры в  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  наблюдается снижение степени извлечения в 2,5 раза, что обусловлено термолабильностью

умифеновира. Таким образом, предложенные условия ЖЭД донных отложений в сочетании с определением целевых аналитов методом ВЭЖХ-ИСП-МС обеспечивает достижение предела обнаружения и нижней границы определяемых концентраций на уровне 2 и 6,6 мкг/кг, соответственно.

Для установления точности и стабильности методики, а также матричных влияний проведен анализ донных отложений, активного ила, сточных и речных вод с добавкой умифеновира на уровнях 1, 10 и 100 НПОК. Образцы анализировали в течение двух дней, для определения внутрисуточной повторяемости и промежуточной (междневной) прецизионности (табл. 11-12). В результате установлено, что метод ВЭЖХ-ИСП-МС не подвержен матричным влияниям со стороны исследуемых объектов, и правильность определения умифеновира находится в диапазоне от 91 до 109 %, внутрисуточная повторяемость и промежуточная прецизионности составили не более 8 % и 13 %, соответственно.

Таблица 11. Оценка правильности и воспроизводимости методики (однодневная)

Объект	Введено, нг/л	Найдено, нг/л	Правильность ( $e_r$ ), %	Относительное стандартное отклонение ( $s_r$ ), %
Деионизованная вода	1	1,0	2,3	7,6
	10	10,3	3,0	5,6
	100	102	2,3	3,8
Природная вода	1	1,0	4,7	6,1
	10	9,6	-4,0	5,3
	100	103	3,3	4,5
Сточная вода	1	1,0	1,3	7,5
	10	9,6	-3,7	6,1
	100	102	1,7	4,0
Объект	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	Правильность ( $e_r$ ), %	Относительное стандартное отклонение ( $s_r$ ), %
Донные отложения	10	10	-1,0	8,2
	100	96	-4,0	5,6
	1000	997	-0,3	5,0
Активный ил	10	10	-1,0	8,2
	100	103	3,3	7,6
	1000	1020	2,0	3,6

Таблица 12. Оценка правильности и воспроизводимости методики (междневная)

Объект	Введено, нг/л	Найдено, нг/л	Правильность ( $e_r$ ), %	Относительное стандартное отклонение ( $s_r$ ), %
Деионизованная вода	1	1,0	-2,3	7,4
	10	9,9	-1,3	5,7
	100	96	-4,0	3,6
Природная вода	1	1,0	-0,7	5,1
	10	11	8,3	4,5
	100	92	-8,0	3,5
Сточная вода	1	1,0	4,3	9,5
	10	9,5	-5,3	4,9
	100	102	2,0	2,6
Объект	Введено, мкг/кг	Найдено, мкг/кг	Правильность ( $e_r$ ), %	Относительное стандартное отклонение ( $s_r$ ), %
Донные отложения	10	9,9	-1,0	12,5
	100	108	7,7	5,1
	1000	1020	2,0	7,2
Активный ил	10	11	6,0	11,3
	100	94	-6,0	9,0
	1000	913	-8,7	5,5

Предложенная методика была применена к определению умифеновира и трех его метаболитов в сточных и природных водах, а также осадках сточных вод и донных отложениях характеризуются высокой чувствительностью, что позволяет контролировать содержание данных аналитов на следовом уровне [183–184]. Для апробации предложенного подхода проведен анализ образцов, отобранных на станции очистки муниципальных сточных вод г. Архангельска в ноябре 2022 г. Образцы сточных вод (СВ-1) и (СВ-2) были отобраны на этапе механической очистки стоков и после этапа обработки гипохлоритом натрия, соответственно. Речная природная вода РВ и донные отложения (ДО) отобрана из реки Хаторица на расстоянии ~2 км ниже по течению от места сброса очищенных сточных вод. Смесь осадка сточных вод с активным илом (АИ) отобраны из отстойника после стадии биологической очистки. Примеры хроматограмм экстракта активного ила представлены на рисунке 26. При обнаружении целевых соединений проводился расчет их содержания на основе градуировочной зависимости, полученной с использованием коммерчески доступного аналитического стандарта умифеновира.

Представленные результаты (табл. 13) демонстрируют, что в поступающих на очистные городские сооружения сточных водах присутствуют как сам умифеновир, так и один из важнейших его метаболитов (метаболит III), образование которого обусловлено окислением атома серы с образованием сульфоновой группы. После прохождения всех стадий очистки (механическая, биологическая и дезинфекция активным хлором), содержание фармацевтического препарата снижается на 2 порядка, что свидетельствует об эффективности используемой технологии подготовки воды в отношении данного загрязнителя [185].

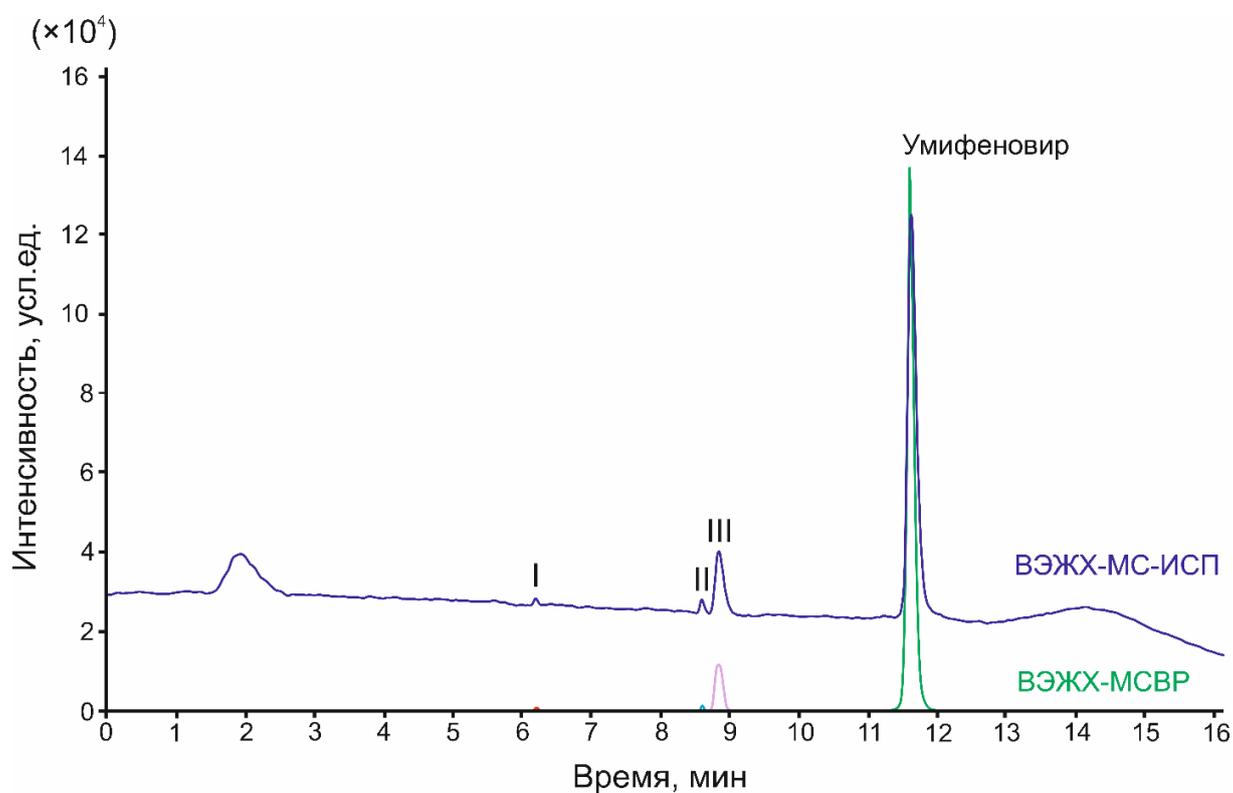


Рисунок 26 – Хроматограммы экстракта активного ила (образец АИ), полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием в режиме масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (сверху) и масс-спектрометрии высокого разрешения (снизу)

Таблица 13. Результаты определения умифеновира и его метаболитов в реальных объектах

Аналит		Метаболит I	Метаболит II	Метаболит III	Умифеновир
t <sub>R</sub> , мин		6,2	8,7	8,9	11,8
Брутто формула		C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
Молекулярная масса		385,2578	447,3287	493,4216	477,4222
Массовая доля (Br), %		21	18	16	17
Концентрация, нг/л	<b>СВ-1</b>	-*	-	43 ± 3	260 ± 20
	<b>СВ-2</b>	-	-	7,6 ± 0,5	4,4 ± 0,3
	<b>РВ</b>	-	-	-	-
Содержание, мкг/кг	<b>АИ</b>	27 ± 3	98 ± 8	600 ± 50	3700 ± 400
	<b>ДО</b>	-	-	-	-

\* – ниже НПОК

Необходимо отметить, что в период с 2021 на 2022 год на центральных очистных сооружениях канализации города Архангельска проводилась реконструкция, в результате которой было введено в эксплуатацию дополнительное количество отстойников и был произведен переход с порционного добавления гипохлорита натрия на этапе дезинфекции, на непрерывную подачу.

В результате, в речной воде и донных отложениях не удалось обнаружить контролируемые соединения, что может так же объясняться значительным разбавлением очищенных стоков после сброса. Обращает на себя внимание изменение соотношения умифеновир/метаболит III до и после очистки. На выходе с очистных сооружений доля метаболита значительно увеличивается, что может быть вызвано интенсификацией окислительных процессов с участием умифеновира в аэротенках с активным илом или в ходе дезинфекции.

Наибольшие концентрации умифеновира были обнаружены в экстрактах активного ила, которые достигают  $3,7 \pm 0,4$  мг/кг. Помимо этого, были обнаружены все контролируемые продукты, среди которых доминирует метаболит III ( $600 \pm 50$  мкг/кг), а минимальными содержаниями характеризуется метаболит I ( $27 \pm 3$  мкг/кг). Несмотря на очевидную эффективность удаления умифеновира при очистке сточных вод, значительная доля данного фармацевтического препарата и его метаболитов способна накапливаться активным илом. Последний, после выведения их технологического процесса, вывозится и складывается на иловых площадках, где может выступать в качестве источника вторичного загрязнения объектов окружающей среды. Это обуславливает необходимость проведения контроля за содержанием умифеновира и его метаболитов не только в сбрасываемых очищенных водах, но и в местах хранения отработанного активного ила и прилегающих водоемах.

## ВЫВОДЫ

1. Предложен подход к высокочувствительному и селективному определению амброксола, бромгексина, умифеновира и бромсодержащих побочных продуктов их дезинфекции методом ВЭЖХ с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием ИСП-МС и МСВР, без предварительной пробоподготовки на уровне концентрации 0,4 мкг/л (в пересчете на бром).

2. Изучена трансформация исследуемых фармацевтических препаратов в условиях водного хлорирования. Установлено, что умифеновир образует 14 промежуточных продуктов трансформации, а бромгексин и амброксол – 21 и 6 продуктов, соответственно. При глубокой трансформации муколитических препаратов наряду с прогнозируемыми ППД образуются галоанилины (идентифицировано 9 новых представителей), а также впервые показана возможность образования галоиндазолов.

3. Проведена экоаналитическая оценка содержания умифеновира, бромгексина, амброксола и продуктов их трансформации в сточных и природных водах, активном иле и донных отложениях. Идентифицированы и определены умифеновир и три продукта его трансформации, которые в значительных количествах накапливаются в активном иле очистных сооружений на уровне концентраций: умифеновир (1260 мкг/кг), продукт III (метаболит I; 1,3 мкг/кг), продукт VI (метаболит II; 13 мкг/кг) и продукт VII (метаболит III; 270 мкг/кг).

4. Разработана методика определения умифеновира и трех его метаболитов в объектах окружающей среды: метаболит I – (этил-6-бром-4-((диметиламино)метил)-5-гидрокси-2-(гидроксиметил)-1-метил-1H-индол-3-карбоксилат), метаболит II – (этил-6-бром-5-гидрокси-1-метил-4-(метиламино)метил)-2-фенилсульфоксидметилиндол-3-карбоксилат) и метаболит III (этил-6-бром-5-гидрокси-1-метил-4-(диметиламино)метил)-2-фенилсульфоксидметилиндол-3-карбоксилат). Обращено-фазовое

хроматографическое разделение и детектирование методом МСВР обеспечило надежное обнаружение и идентификацию аналитов в сложных матрицах. Метод ИСП-МС с регистрацией сигнала  $^{79}\text{Br}$  позволил устранить матричные эффекты и использовать единый аналитический стандарт для их количественного определения. Твердофазная и жидкостная экстракции под давлением в методе пробоподготовки позволили достичь пределов обнаружения аналитов (в пересчете на бром) 0,2 нг/л в сточных и природных водах, и 2 мкг/кг в активном иле и донных отложениях.

5. Проведена апробация разработанной методики на реальных образцах сточной воды, активного ила и объектов окружающей среды. В муниципальных сточных водах определили умифеновир в концентрациях от 4,4 до 260 нг/л и его метаболит III от 23 до 7,6 нг/л. Наибольшее содержание исходного фармацевтического препарата –  $3,7 \pm 0,4$  мкг/кг, а также трех контролируемых метаболитов выявили в активном иле: метаболит I –  $27 \pm 3$  мкг/кг, метаболит II –  $98 \pm 8$  мкг/кг и метаболит III –  $600 \pm 50$  мкг/кг.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей работе применяются следующие определения, обозначения и сокращения:

Br-ППД – бромсодержащие побочные продукты дезинфекции

Cl-ППД – хлорсодержащие побочные продукты дезинфекции

COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года

EPA – (англ. United States Environmental Protection Agency) - Агентство по охране окружающей среды США

NIST – (англ. The National Institute of Standards and Technology) — Национальный институт стандартов и технологий США

N-ППД – азотсодержащие побочные продукты дезинфекции

SARS-CoV-2 – вирус, впервые обнаруженный в декабре 2019 года

АИ – смесь осадка сточных вод с активным илом

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГА – галоген анилины

ГАН – галоген ацетонитрилы

ГУК – галоген уксусные кислоты

ГХ – Газовая хроматография

ДАС – диссоциация активированная соударениями

ДО – донные отложения (речные)

ДЭЗ – детектор электронного захвата

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

ЖЭД – жидкостная экстракция под давлением

ИСП-МС – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

ИЭР – ионизация электрораспылением

КРИ – коллизионно-реакционный интерфейс

ЛД<sub>50</sub> – средняя смертельная доза

МС/МС – тандемная масс-спектрометрия

МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения

НПОК – нижний предел определяемых концентраций  
ПО – предел обнаружения  
ППД – побочные продукты дезинфекции  
РВ – речная вода  
СВ-1 – сточная вода поступающая на очистные сооружения  
СВ-2 – сточная вода выходящая с очистных сооружений  
ТГМ – тригалогенметаны  
ТФМЭ – твердофазная микроэкстракция  
ТФЭ – твердофазная экстракция  
УЗЭ – ультразвуковая экстракция  
УФ - ультрафиолет  
ФП – фармацевтические препараты  
ЭИ – электронная ионизация

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. СанПиН 2.1.5.980–00. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы.
2. Afolalu, S.A. Waste pollution, wastewater and effluent treatment methods—An overview / S.A. Afolalu, O. M. Ikumapayi, T. S. Ogedengbe, R.A. Kazeem, A.T. Ogundipe // *Materials Today: Proceedings*. – 2022. – Vol. 62. – P. 3282-3288.
3. Wang, J. Toxicity changes of wastewater during various advanced oxidation processes treatment: An overview. / J. Wang, S. Wang // *Journal of Cleaner Production*. – 2021. – Vol. 315. – 128202.
4. Karri R.R., Ravindran G., Dehghani M. H. Wastewater—sources, toxicity, and their consequences to human health // *Soft computing techniques in solid waste and wastewater management*. – Elsevier. – 2021. – P. 3-33.
5. Vogelsang, C. Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway / C. Vogelsang, M. Grung, T.G. Jantsch, K.E. Tollefsen, H. Liltved // *Water research*. – 2006. – Vol. 40. – No. 19. – P. 3559-3570.
6. McNally, D.L. Biodegradation of three-and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions / D.L. McNally, J.R. Mihelcic, D.R. Lueking // *Environmental science & technology*. – 1998. – Vol. 32. – No. 17. – P. 2633-2639.
7. Fauser, P. Phthalates, nonylphenols and LAS in an alternately operated wastewater treatment plant—fate modelling based on measured concentrations in wastewater and sludge / P. Fauser, J. Vikelsøe, P.B. Sørensen, L. Carlsen // *Water research*. – 2003. – Vol. 37. – No. 6. – P. 1288-1295.
8. Lazarova, V. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives / V. Lazarova, P. Savoye, M.L. Janex, E.R. Blatchley Iii, M. Pommepuy // *Water science and technology*. – 1999. – Vol. 40. – No. 4-5. – P. 203-213.

9. Amin, M.M. A review on wastewater disinfection / M.M. Amin, H. Hashemi, A.M. Bovini // *International Journal of Environmental Health Engineering*. – 2013. – Vol. 2. – No. 1. – P. 22.
10. Lindenauer, K.G. Ultraviolet disinfection of wastewater: effect of dose on subsequent photoreactivation / K.G. Lindenauer, J.L. Darby // *Water research*. – 1994. – Vol. 28. – No. 4. – P. 805-817.
11. Kitis, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review / M. Kitis // *Environment international*. – 2004. – Vol. 30. – No. 1. – P. 47-55.
12. Cheng, X. Current status of hypochlorite technology on the wastewater treatment and sludge disposal: Performance, principals and prospects / X. Cheng, S. Wang, W. Huang, F. Wang, S. Fang // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 803. 150085.
13. Решняк, В.И. Обеззараживание сточной воды / В.И. Решняк, С.Е. Посашкова // *Вестник государственного университета морского и речного флота им. адмирала С.О. Макарова*. – 2012. – No. 2(14). – С. 177-182.
14. Bonetta, S. Comparison of UV, peracetic acid and sodium hypochlorite treatment in the disinfection of urban wastewater / S. Bonetta, C. Pignata, S. Bonetta, G. Amagliani, G. Brandi // *Pathogens*. – 2021. – Vol. 10. – No. 2. 182.
15. Voukkali, I. Disinfection methods and by-products formation / I. Voukkali, A.A. Zorpas // *Desalination and Water Treatment*. – 2015. – Vol. 56. – No. 5. – P. 1150-1161.
16. Singer, P.C. Control of disinfection by-products in drinking water / P.C. Singer // *Journal of environmental engineering*. – 1994. – Vol. 120. – No. 4. – P. 727-744.
17. Richardson, S.D. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research / S.D. Richardson, M.J. Plewa, E.D. Wagner, R. Schoeny, D.M. DeMarini // *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* – 2007. – Vol. 636. – P. 178-242.

18. Romanucci, V. Disinfection by-products and ecotoxic risk associated with hypochlorite treatment of irbesartan / V. Romanucci, A. Siciliano, M. Guida, G. Libralato, L. Saviano // *Sci. Total Environ.* – 2020. – Vol. 712. 135625.
19. Romanucci, V. Disinfection by-products and ecotoxic risk associated with hypochlorite treatment of tramadol / V. Romanucci, A. Siciliano, E. Galdiero, M. Guida, G. Luongo // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. 693.
20. Li, Z. Occurrence and ecological risk assessment of disinfection byproducts from chlorination of wastewater effluents in East China / Z. Li, X. Liu, Z. Huang, S. Hu, J. Wang // *Water research.* – 2019. – Vol. 157. 247-257.
21. Tian, C. Disinfection by-products formation and precursors transformation during chlorination and chloramination of highly-polluted source water: significance of ammonia / C. Tian, R. Liu, H. Liu, J. Qu // *Water Research.* – 2013. – Vol. 47. – No. 15. – P. 5901-5910.
22. Gong, T. Detection, identification and formation of new iodinated disinfection byproducts in chlorinated saline wastewater effluents / T. Gong, X. Zhang // *Water research.* – 2015. – Vol. 68. – P. 77-86.
23. Ding, G. Formation of new brominated disinfection byproducts during chlorination of saline sewage effluents / G. Ding, X. Zhang, M. Yang, Y. Pan // *Water research.* – 2013. – Vol. 47. – No. 8. – P. 2710-2718.
24. Cheng, S. The multiple role of bromide ion in PPCPs degradation under UV/chlorine treatment / S. Cheng, X. Zhang, X. Yang, C. Shang, W. Song // *Environmental science & technology.* – 2018. – Vol. 52. – No. 4. – P. 1806-1816.
25. Deblonde, T. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature / T. Deblonde, C. Cossu-Leguille, P. Hartemann // *International journal of hygiene and environmental health.* – 2011. – Vol. 214. – No. 6. – P. 442-448.
26. Yang, X. PPCP degradation by UV/chlorine treatment and its impact on DBP formation potential in real waters / X. Yang, J. Sun, W. Fu, C. Shang, Y. Li // *Water research.* – 2016. – Vol. 98. – P. 309-318.

27. Классификация фармакологических групп. [Электронный ресурс] // Регистр лекарственных средств России. URL: <https://www.rlsnet.ru/pharm-groups> (дата обращения: 13.05.2024).
28. Boogaerts, T. Current and future perspectives for wastewater-based epidemiology as a monitoring tool for pharmaceutical use / T. Boogaerts, F. Ahmed, P.M. Choi, B. Tschärke, J. O'Brien // *Science of the Total Environment*. – 2021. – Vol. 789. 148047.
29. Casas, M.E. Showcasing the potential of wastewater-based epidemiology to track pharmaceuticals consumption in cities: comparison against prescription data collected at fine spatial resolution / M.E. Casas, N.S. Schröter, I. Zammit, M. Castaño-Trias, S. Rodríguez-Mozaz // *Environment International*. – 2021. – Vol. 150. 106404.
30. Quireyns, M. Temporal monitoring of pharmaceutical consumption using a wastewater-based epidemiologic approach / M. Quireyns, T. Boogaerts, N. Van Wichelen, B. Pussig, H. De Loof // *Toxicologie Analytique et Clinique*. – 2022. – Vol. 34. – No. 3. S72.
31. Dong, S. Toxicity of wastewater with elevated bromide and iodide after chlorination, chloramination, or ozonation disinfection / S. Dong, N. Masalha, M.J. Plewa, T.H. Nguyen // *Environmental Science & Technology*. – 2017. – Vol. 51. – No. 16. 9297-9304.
32. Reyes, N.J.D. Pharmaceutical and personal care products in different matrices: occurrence, pathways, and treatment processes / N.J.D. Reyes, F.K.F. Geronimo, K.A.V Yano, H.B. Guerra, L.H. Kim // *Water*. – 2021. – Vol. 13. – No. 9. 1159.
33. Karnjanapiboonwong, A. Occurrence of PPCPs at a wastewater treatment plant and in soil and groundwater at a land application site / A. Karnjanapiboonwong, J.G. Suski, A.A. Shah, Q. Cai, A.N. Morse // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2011. – Vol. 216. – P. 257-273.
34. Ren, B. Comprehensive evaluation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in urban sewers: degradation, intermediate products and

- environmental risk / B. Ren, X. Shi, X. Jin, X.C. Wang, P. Jin // *Chemical Engineering Journal*. – 2021. – Vol. 404. 127024.
35. Evgenidou, E.N. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review / E.N. Evgenidou, I.K. Konstantinou, D.A. Lambropoulou // *Science of the Total Environment*. – 2015. – Vol. 505. 905-926.
36. Nguyen, P.Y. A review of the biotransformations of priority pharmaceuticals in biological wastewater treatment processes / P.Y. Nguyen, G. Carvalho, M.A. Reis, A. Oehmen // *Water Research*, 188, 116446.
37. Carballa, M. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge / M. Carballa, F. Omil, T. Ternes, J.M. Lema // *Water research*. – 2007. – Vol. 41. – No. 10. – P. 2139-2150.
38. Kacprzak, M. Sewage sludge disposal strategies for sustainable development / M. Kacprzak, E. Neczaj, K. Fijałkowski, A. Grobelak, A. Grosser // *Environmental research*. – 2017. – Vol. 156. – P. 39-46.
39. Andreoli, C.V. Sludge treatment and disposal / C.V. Andreoli, M. Von Sperling, F. Fernandes // IWA publishing. – 2007.
40. Postigo, C. Transformation of pharmaceuticals during oxidation/disinfection processes in drinking water treatment / C. Postigo, S.D. Richardson // *Journal of hazardous materials*. – 2014. – Vol. 279. – P. 461-475.
41. Yin, L. Pay special attention to the transformation products of PPCPs in environment / L. Yin, B. Wang, H. Yuan, S. Deng, J. Huang // *Emerging Contaminants*. – 2017. – Vol. 3. – No. 2. – P. 69-75.
42. Subramanian, A. Comparative risk assessment studies estimating the hazard posed by long-term consumption of PPCPs in river water / A. Subramanian, M. Saravanan, B. Rajasekhar, S. Chakraborty, K. Sivagami // *Food and Chemical Toxicology*. – 2023. 114169.
43. Dey S. Pharmaceuticals and personal care product (PPCP) contamination—a global discharge inventory / S. Dey, F. Bano, A. Malik // *Pharmaceuticals and*

- personal care products: waste management and treatment technology. – Butterworth-Heinemann. – 2019. – P. 1-26.
44. Conceicao, K.C. Seasonal behavior of pharmaceuticals and personal care products within Chilean rural WWTPs under COVID-19 pandemic conditions / K.C. Conceicao, C.A. Villamar-Ayala, A. Plaza-Garrido, C. Toledo-Neira // Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2023. – Vol. 11. – No. 5. 110984.
45. Di Marcantonio, C. Impact of COVID19 restrictions on organic micropollutants in wastewater treatment plants and human consumption rates / C. Di Marcantonio, A. Chiavola, V. Gioia, A. Frugis, G. Cecchini // Science of the Total Environment. – 2022. – Vol. 811. 152327.
46. Frediansyah, A. Antivirals for COVID-19: a critical review / A. Frediansyah, R. Tiwari, K. Sharun, K. Dhama, H. Harapan // Clinical Epidemiology and global health. – 2021. – Vol. 9. – P. 90-98.
47. Proskurnina, E.V. Antioxidant potential of antiviral drug umifenovir / E.V. Proskurnina, D.Y. Izmailov, M.M. Sozarukova, T.A. Zhuravleva, I.A. Leneva // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – No. 7. 1577.
48. Wang, X. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro / X. Wang, R. Cao, H. Zhang, J. Liu, M. Xu // Cell discovery. – 2020. – Vol. 6. – No. 1. 28.
49. Vankadari, N. Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein / N. Vankadari // International journal of antimicrobial agents. – 2020. – Vol. 56. – No. 2. 105998.
50. Huang, D. Efficacy and safety of umifenovir for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis / D. Huang, H. Yu, T. Wang, H. Yang, R. Yao // Journal of medical virology. – 2021. – Vol. 93. – No. 1. – P. 481-490.
51. Instructions for the Medical Use of Arbidol [Электронный ресурс] // URL: <http://www.arbidol.org/dosage.pdf> (дата обращения 13.05.2024)

52. Balakin, K.V. Arbidol: a quarter-century after. Past, present and future of the original Russian antiviral / K.V. Balakin, R. Filosa, S.N. Lavrenov, A.S. Mkrtchyan, M.B. Nawrozkiy // Russian Chemical Reviews. – 2018. – Vol. 87. – No. 6. 509.
53. Wang, Y. Metabolite identification of arbidol in human urine by the study of CID fragmentation pathways using HPLC coupled with ion trap mass spectrometry / Y. Wang, X. Chen, Q. Li, D. Zhong // Journal of mass spectrometry. – 2008. – Vol. 43. – No. 8. – P. 1099-1109.
54. Deng, P. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of the antiviral drug arbidol in humans / P. Deng, D. Zhong, K. Yu, Y. Zhang, T. Wang // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – Vol. 57. – No. 4. – P. 1743-1755.
55. Kuroda, K. Predicted occurrence, ecotoxicological risk and environmentally acquired resistance of antiviral drugs associated with COVID-19 in environmental waters / K. Kuroda, C. Li, K. Dhangar, M. Kumar // Science of the Total Environment. – 2021. – Vol. 776. 145740.
56. Руководство по домашнему лечению людей, инфицированных COVID- 19 [Электронный ресурс] // Национальная комиссия здравоохранения Китайской Народной Республики URL: <http://www.nhc.gov.cn/ylyjs/pqt/202212/2b6c16cc176b4806b399ea5588353b3c.shtml> (дата обращения: 13.05.2024)
57. Инструкция по медицинскому применению амброксола [Электронный ресурс] // Озон Фармасьютикалс, Россия. URL: <https://ozonpharm.ru/upload/iblock/34e/34e81ef3ed54650b63e44252efdfb515.pdf> (дата обращения: 13.05.2024)
58. Инструкция по медицинскому применению бромгексина [Электронный ресурс] // Озон Фармасьютикалс, Россия. URL: [https://ozonpharm.ru/upload/iblock/66a/Inst.-Bromgeksin\\_-tab.-8mg.pdf](https://ozonpharm.ru/upload/iblock/66a/Inst.-Bromgeksin_-tab.-8mg.pdf) (дата обращения: 13.05.2024)

59. Liu, J. Quantification of the major metabolites of bromhexine in human plasma using RRLC–MS/MS and its application to pharmacokinetics / J. Liu, X. Chen, Y. Hu, G. Cheng, D. Zhong // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2010. – Vol. 51. – No. 5. – P. 1134-1141.
60. Schraven, E. Excretion, isolation and identification of the metabolites of Bisolvon® / E. Schraven, F.W. Koss, J. Keck, G. Beisenherz // European Journal of Pharmacology. – 1967. – Vol. 1. – No. 5. – P. 445-451.
61. Aizawa H., Gan L. L., Prakash C. Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics. – 2014.
62. Wang, W. Degradation kinetics and formation of regulated and emerging disinfection by-products during chlorination of two expectorants ambroxol and bromhexine / W. Wang, Z. Zhou, S. Ding, W. Yang, W. Jin // Water Research. – 2023. – Vol. 235. 119927.
63. Wu, Q.Y. Non-volatile disinfection byproducts are far more toxic to mammalian cells than volatile byproducts / Q.Y. Wu, Z.F. Liang, W.L. Wang, Y. Du, H. Hu // Water Research. – 2020. – Vol. 183. 116080.
64. Pérez-Lemus, N. Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review / N. Pérez-Lemus, R. López-Serna, S.I. Pérez-Elvira, E. Barrado // Analytica chimica acta. – 2019. – Vol. 1083. – P. 19-40.
65. Richardson, S.D. Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water / S.D. Richardson // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2003. – Vol. 22. – No. 10. – P. 666-684.
66. EPA Method 551.1: Determination of Chlorination Disinfection Byproducts, Chlorinated Solvents, and Halogenated Pesticides/Herbicides in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography With Electron-Capture Detection [Электронный ресурс] // URL: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/epa-551.1.pdf> (дата обращения 13.05.2024)

67. Han, J. Characterization of halogenated DBPs and identification of new DBPs trihalomethanols in chlorine dioxide treated drinking water with multiple extractions / J. Han, X. Zhang, J. Liu, X. Zhu, T. Gong // *Journal of Environmental Sciences*. – 2017. – Vol. 58. – P. 83-92.
68. Kristiansen, N.K. Identification of halogenated compounds in chlorinated seawater and drinking water produced offshore using n-pentane extraction and open-loop stripping technique / N.K. Kristiansen, M. Froeshaug, K.T. Aune, G. Becher, E. Lundanes // *Environmental science & technology*. – 1994. – Vol. 28. – No. 9. – P. 1669-1673.
69. Kristiansen, N.K. Determination of halogenated acetic acids in chlorinated sea water and drinking water produced offshore / N.K. Kristiansen, K.T. Aune, M. Frøshaug, G. Becher, E. Lundanes // *Water Research*. – 1996. – Vol. 30. – No. 9. – P. 2155-2159.
70. Chen, T.L. Rapid screening of haloacetamides in water using salt-assisted liquid–liquid extraction coupled injection-port silylation gas chromatography–mass spectrometry / T.L. Chen, S.H. Tzing, W.H. Ding // *Journal of Chromatography A*. – 2015. – Vol. 1422. – P. 340-344.
71. Yang, M. Current trends in the analysis and identification of emerging disinfection byproducts / M. Yang, X. Zhang // *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 10. – P. 24-34.
72. Cancho, B. Determination, synthesis and survey of iodinated trihalomethanes in water treatment processes / B. Cancho, F. Ventura, M. Galceran, A. Diaz, S. Ricart // *Water Research*. – 2000. – Vol. 34. – No. 13. – P. 3380-3390.
73. Golfinopoulos, S.K. Disinfection by-products and volatile organic compounds in the water supply system in Athens, Greece / S.K. Golfinopoulos, A.D. Nikolaou // *Journal of Environmental Science and Health Part A*. – 2001. – Vol. 36. – No. 4. – P. 483-499.
74. Sadutto, D. Sample preparation to determine pharmaceutical and personal care products in an all-water matrix: solid phase extraction / D. Sadutto, Y. Picó // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – No. 21. 5204.

75. Alexandrou, L.D. Micro versus macro solid phase extraction for monitoring water contaminants: A preliminary study using trihalomethanes / L.D. Alexandrou, M.J. Spencer, P.D. Morrison, B.J. Meehan, O.A. Jones // *Science of the Total Environment*. – 2015. – Vol. 512. 210-214.
76. Hu, S. Simultaneous determination of iodinated haloacetic acids and aromatic iodinated disinfection byproducts in waters with a new SPE-HPLC-MS/MS method / S. Hu, T. Gong, J. Ma, Y. Tao, Q. Xian // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 198. – P. 147-153.
77. EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS [Электронный ресурс] // URL: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method\\_1694\\_2007.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf) (дата обращения 13.05.2024)
78. Huerta-Fontela, M. Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources / M. Huerta-Fontela, M.T. Galceran, F. Ventura // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217. – No. 25. – P. 4212-4222.
79. Grujić, S. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry / S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević // *Journal of Chromatography A*. – 2009. – Vol. 1216. – No. 25. – P. 4989-5000.
80. Nödler, K. Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples / K. Nödler, T. Licha, K. Bester, M. Sauter // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – Vol. 1217. – No. 42. – P. 6511-6521.
81. Wang, X.M. Nitrogen-rich covalent organic frameworks as solid-phase extraction adsorbents for separation and enrichment of four disinfection by-products in drinking water / X.M. Wang, W.H. Ji, L.Z. Chen, J.M. Lin, X. Wang // *Journal of Chromatography A*. – 2020. – Vol. 1619. 460916.

82. Zhang, D. Trace determination and occurrence of eight chlorophenylacetonitriles: An emerging class of aromatic nitrogenous disinfection byproducts in drinking water / D. Zhang, T. Bond, S.W. Krasner, W. Chu, Y. Pan // *Chemosphere*. – 2019. – Vol. 220. – P. 858-865.
83. Andersson, A. Evaluating gas chromatography with a halogen-specific detector for the determination of disinfection by-products in drinking water / A. Andersson, M.J. Ashiq, M. Shoeb, S. Karlsson, D. Bastviken // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – Vol. 26. – P. 7305-7314.
84. Hu, S. Simultaneous determination of iodinated haloacetic acids and aromatic iodinated disinfection byproducts in waters with a new SPE-HPLC-MS/MS method / S. Hu, T. Gong, J. Ma, Y. Tao, Q. Xian // *Chemosphere*. – 2018. – Vol. 198. – P. 147-153.
85. Tang, H. An Online-SPE/SEC/LCMS Method for the Detection of N-Nitrosamine Disinfection Byproducts in Wastewater Plant Tailwater / H. Tang, Z. Li, H. Chen, Y. Xu, X. Jiang // *Water*. – 2022. – Vol. 14. – No. 15. 2371.
86. Kadmi, Y. A highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of a toxic water disinfection by-product, N-nitrosomethylethylamine / Y. Kadmi, L. Favier, M. Lotfi, N. Nasrallah, D. Wolbert // *Analytical methods*. – 2014. – Vol. 6. – No. 10. – P. 3231-3234.
87. Bojko, B. SPME–Quo vadis? / B. Bojko, E. Cudjoe, G.A. Gómez-Ríos, K. Gorynski, R. Jiang // *Analytica Chimica Acta*. – 2012. – Vol. 750. – P. 132-151.
88. Zheng, J. Latest improvements and expanding applications of solid-phase microextraction / J. Zheng, Y. Kuang, S. Zhou, X. Gong, G. Ouyang // *Analytical Chemistry*. – 2023. – Vol. 95. – No. 1. – P. 218-237.
89. Niri, V.H. Fast analysis of volatile organic compounds and disinfection by-products in drinking water using solid-phase microextraction–gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry / V.H. Niri, L. Bragg, J. Pawliszyn // *Journal of Chromatography A*. – 2008. – Vol. 1201. – No. 2. – P. 222-227.

90. Sajid, M. Microextraction techniques as versatile platforms for sample preparation of disinfection byproducts from aqueous media: Advances and challenges / M. Sajid, E. Alkhulaify, N. Baig, K. Alhooshani // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2023. 117487.
91. González-Hernández, P. Monitoring trihalomethanes and nitrogenous disinfection by-products in blending desalinated waters using solid-phase microextraction and gas chromatography / P. González-Hernández, M. Hernández-Padrón, V. Pino, A.M. Afonso, J.H. Ayala // *Environmental technology*. – 2017. – Vol. 38. – No. 7. – P. 911-922.
92. Loyola-Sepulveda, R. Trihalomethanes in the drinking water of Concepción and Talcahuano, Chile / R. Loyola-Sepulveda, G. Lopez-Leal, J. Munoz, C. Bravo-Linares, S.M. Mudge // *Water and Environment Journal*. – 2009. – Vol. 23. – No. 4. – P. 286-292.
93. Cardador, M.J. Optimisation and comparison of several microextraction/methylation methods for determining haloacetic acids in water using gas chromatography / M.J. Cardador, M. Gallego // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2010. – Vol. 396. – P. 1331-1343.
94. Heaven, M.W. Matrix effects of milk, dairy factory wastewater and soil water on the determination of disinfection by-products and para-cresol using solid-phase microextraction / M.W. Heaven, T.V. Verheyen, A. Reynolds, K. Wild, M. Watkins // *International Journal of Dairy Technology*. – 2014. – Vol. 67. – No. 1. – P. 55-66.
95. Kermani, F.R. Application of automated solid-phase microextraction to determine haloacetonitriles, halo ketones, and chloropicrin in Canadian drinking water / F.R. Kermani, A.M. Tugulea, J. Hnatiw, V.H. Niri, J. Pawliszyn // *Water Quality Research Journal of Canada*. – 2013. – Vol. 48. – No. 1. – P. 85-98.
96. López-Serna, R. Multiresidue analytical method for pharmaceuticals and personal care products in sewage and sewage sludge by online direct immersion SPME on-fiber derivatization–GCMS / R. López-Serna, D. Marín-de-Jesús,

- R. Irusta-Mata, P.A. García-Encina, R. Lebrero // *Talanta*. – 2018. – Vol. 186. – P. 506-512.
97. Gago-Ferrero, P. Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry / P. Gago-Ferrero, V. Borova, M.E. Dasenaki, N.S. Thomaidis // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2015. – Vol. 407. – P. 4287-4297.
98. Shen, L. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies / L. Shen, S. Pang, M. Zhong, Y. Sun, A. Qayum // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2023. 106646.
99. Llompart, M. Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment / M. Llompart, M. Celeiro, T. Dagnac // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 116. – P. 136-150.
100. Křesinová, Z. Method for analysis of psychopharmaceuticals in real industrial wastewater and groundwater with suspended organic particulate matter using solid phase extraction disks extraction and ultra-high performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry / Z. Křesinová, L. Linhartová, K. Petruš, L. Krejčová, K. Šrédlová // *Journal of Chromatography A*. – 2016. – Vol. 1440. – P. 15-22.
101. Vom Eyser, C. Determination of pharmaceuticals in sewage sludge and biochar from hydrothermal carbonization using different quantification approaches and matrix effect studies / C. Vom Eyser, K. Palmu, R. Otterpohl, T.C. Schmidt, J. Türk // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2015. – Vol. 407. – P. 821-830.
102. Jelic, A. Tracing pharmaceuticals in a municipal plant for integrated wastewater and organic solid waste treatment / A. Jelic, F. Fatone, S. Di Fabio, M. Petrovic, F. Cecchi // *Science of the total environment*. – 2012. – Vol. 433. – P. 352-361.

103. Gao, P. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: mass balance and removal processes / P. Gao, Y. Ding, H. Li, I. Xagorarakis // *Chemosphere*. – 2012. – Vol. 88. – No. 1. – P. 17-24.
104. Gao, P. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant / P. Gao, M. Munir, I. Xagorarakis // *Science of the total environment*. – 2012. – Vol. 421. – P. 173-183.
105. Chen, Y. Determination of pharmaceuticals from various therapeutic classes in dewatered sludge by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) / Y. Chen, Q. Cao, S. Deng, J. Huang, B. Wang // *International journal of environmental analytical chemistry*. – 2013. – Vol. 93. – No. 11. – P. 1159-1173.
106. Barón, E. Gas chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 19 brominated compounds in environmental and biological samples / E. Barón, E. Eljarrat, D. Barceló // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2014. – Vol. 406. – P. 7667-7676.
107. Wu, T. Traditional methods and biosensors for detecting disinfection by-products in water: A review / T. Wu, H. Karimi-Maleh, D.E. Niculina, P. Puri, D. Zhang // *Environmental research*. – 2023. 116935.
108. Tak, S. A review on disinfection and disinfection byproducts / S. Tak, B.P. Vellanki, S. Ahuja // *Contaminants in our water: identification and remediation methods*. – 2020. – P. 105-117.
109. EPA Method 552.3 Determination of Haloacetic Acids and Dalapon in Drinking Water by Liquid-Liquid Microextraction, Derivatization, and Gas Chromatography with Electron Capture Detection
110. Comprehensive Disinfectants and Disinfection Byproducts Rules (Stage 1 and Stage 2): Quick Reference Guide [Электронный ресурс] // U.S. Environmental Protection Agency URL: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/epa-551.1.pdf> (дата обращения 13.05.2024)

111. Yilmaz, B. Determination of flurbiprofen in pharmaceutical preparations by GC–MS / B. Yilmaz, E. Alkan // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2019. – Vol. 12. - No. 8. – P. 2077-2083.
112. Li, A. Pseudo-template molecularly imprinted polymeric fiber solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for ultrasensitive determination of 2, 4, 6-trihalophenol disinfection by-products / A. Li, X. Huang, L. Yan, J. Cheng // *Journal of Chromatography A*. – 2022. – Vol. 1678. 463322.
113. Cuthbertson, A.A. Trace analysis of 61 emerging Br-, Cl-, and I-DBPs: New methods to achieve part-per-trillion quantification in drinking water / A.A. Cuthbertson, H.K. Liberatore, S.Y. Kimura, J.M. Allen, A.V. Bensussan // *Analytical chemistry*. – 2020. – Vol. 92. – No. 4. – P. 3058-3068.
114. Jia, M. Simultaneous determination of trace levels of nine haloacetic acids in biological samples as their pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography/tandem mass spectrometry in electron capture negative ion chemical ionization mode / M. Jia, W.W. Wu, R.A. Yost, P.A. Chadik, P.W. Stacpoole // *Analytical chemistry*. – 2003. – Vol. 75. – No. 16. – P. 4065-4080.
115. Liu, Y. Determination of volatile disinfection byproducts in water by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry / Y. Liu, J. Duan, W. Li, Q. Lai, C.P. Saint // *Analytical Letters*. – 2015. – Vol. 48. – No. 1. – P. 188-203.
116. Franek, M. Antibody-based methods for surfactant screening // M. Franek, J. Zeravik, S. Eremin, J. Yakovleva, M. Badea // *Fresenius' journal of analytical chemistry*. – 2001. – Vol. 371. – P. 456-466.
117. Taguchi, V.Y. Structural elucidation of disinfection by-products in treated drinking water / V.Y. Taguchi // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2001. – Vol. 15. – No. 7. – P. 455-461.
118. Kimura, S.Y. The DBP exposome: Development of a new method to simultaneously quantify priority disinfection by-products and comprehensively identify unknowns / S.Y. Kimura, A.A. Cuthbertson, J.D. Byer, S.D. Richardson // *Water research*. – 2019. – Vol. 148. – P. 324-333.

119. Postigo, C. Characterization of iodinated disinfection by-products in chlorinated and chloraminated waters using Orbitrap based gas chromatography-mass spectrometry / C. Postigo, C.I. Cojocariu, S.D. Richardson, P.J. Silcock, D. Barcelo // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 408. – P. 3401-3411.
120. Usman, M. Identification of disinfection by-products (DBP) in thermal water swimming pools applying non-target screening by LC-/GC-HRMS / M. Usman, J. Kuckelkorn, A. Kämpfe, C. Zwiener, T.A. Wintgens // *Journal of Hazardous Materials*. – 2023. – Vol. 449. 130981.
121. Lebedev, A.T. Aqueous chlorination of D-limonene / A.T. Lebedev, E.A. Detenchuk, T.B. Latkin, M. Bavcon Kralj, P. Trebše // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – No. 9. 2988.
122. Detenchuk, E.A. Study of the aquatic chlorination of UV filter avobenzone in the presence of inorganic salts by Gas Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry / E.A. Detenchuk, J. Chen, O.V. Polyakova, P. Trebse, S.A. Pokryshkin // *Journal of analytical chemistry*. – 2019. – Vol. 74. – P. 1271-1276.
123. Li, C. Identifying unknown by-products in drinking water using comprehensive two-dimensional gas chromatography–quadrupole mass spectrometry and in silico toxicity assessment / C. Li, D. Wang, N. Li, Q. Luo, X. Xu // *Chemosphere*. – 2016. – Vol. 163. 535-543.
124. Chu, W. Contribution of the antibiotic chloramphenicol and its analogues as precursors of dichloroacetamide and other disinfection byproducts in drinking water / W. Chu, S.W. Krasner, N. Gao, M.R. Templeton, D. Yin // *Environmental Science & Technology*. – 2016. – Vol. 50. – No. 1. – P. 388-396.
125. Chen, W.H. Formation and fates of nitrosamines and their formation potentials from a surface water source to drinking water treatment plants in Southern Taiwan / W.H. Chen, C.Y. Wang, T.H. Huang // *Chemosphere*. – 2016. – Vol. 161. – P. 546-554.

126. Rubirola, A. Formation of new disinfection by-products of priority substances (Directive 2013/39/UE and Watch List) in drinking water treatment / A. Rubirola, M.R. Boleda, M.T. Galceran, E. Moyano // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – Vol. 26. – No. 27. – P. 28270-28283.
127. Zhang, X. Determination of emerging chlorinated byproducts of diazepam in drinking water / X. Zhang, Y. Yang, J. Zhang, Y. Yang, F. Shen // *Chemosphere*. – 2019. – Vol. 218. – P. 223-231.
128. Tran, N.H. Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC–MS/MS and isotope dilution / N.H. Tran, J. Hu, S.L. Ong // *Talanta*. – 2013. – Vol. 113. – P. 82-92.
129. Tang, H. A new group of heterocyclic nitrogenous disinfection byproducts (DBPs) in drinking water: role of extraction pH in unknown DBP exploration / H. Tang, H. Zhong, Y. Pan, Q. Zhou, Z. Huo // *Environmental Science & Technology*. – 2021. – Vol. 55. – No. 10. – P. 6764-6772.
130. Yang, J. Identification, formation, and predicted toxicity of halogenated DBPs derived from tannic acid and its biodegradation products / J. Yang, W. Li, Q. Zhu, M. Yang, J. Li // *Environmental Science & Technology*. – 2019. – Vol. 53. – No. 22. – P. 13019-13030.
131. Liu, X. Characterization of carbonyl disinfection by-products during ozonation, chlorination, and chloramination of dissolved organic matters / X. Liu, R. Liu, B. Zhu, T. Ruan, G. Jiang // *Environmental Science & Technology*. – 2020. – Vol. 54. – No. 4. – P. 2218-2227.
132. Chu, W. Trace determination of 13 haloacetamides in drinking water using liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization / W. Chu, N. Gao, D. Yin, S.W. Krasner, M.R. Templeton // *Journal of Chromatography A*. – 2012. – Vol. 1235. – P. 178-181.
133. Ul'yanovskii, N.V. Cocamidopropyl betaine—a potential source of nitrogen-containing disinfection by-products in pool water / N.V. Ul'yanovskii,

- I.S. Varsegov, S.A. Sypalov, D.M. Mazur, D.S. Kosyakov // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2024. – Vol. 31. – No. 2. – P. 2314-2326.
134. Varsegov, I.S. A chromatography–mass spectrometry study of the transformation of the benzalkonium cation in aqueous solutions under the action of active bromine / I.S. Varsegov, N.V. Ul'yanovskii, D.S. Kosyakov, I.S. Shavrina, A.T. Lebedev // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2022. – Vol. 77. – No. 14. – P. 1752-1759.
135. Kosyakov, D.S. Characterization of disinfection by-products in Arkhangelsk tap water by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry / D.S. Kosyakov, N.V. Ul'yanovskii, M.S. Popov, T.B. Latkin, A.T. Lebedev // *Journal of analytical chemistry*. – 2018. – Vol. 73. – P. 1260-1268.
136. Xie, R. Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry / R. Xie, W. Johnson, S. Spayd, G.S. Hall, B. Buckley // *Analytica chimica acta*. – 2006. – Vol. 578. – No. 2. – P. 186-194.
137. Brennan, R.G. Nano-HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation / R.G. Brennan, S.A.E.B. Murdock, M. Farmand, K. Kahen, S. Samii // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. – 2007. – Vol. 22. – No. 9. – P. 1199-1205.
138. Duarte, F.A. Evaluation of liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for arsenic speciation in water from industrial treatment of shale / F.A. Duarte, J.S.F. Pereira, M.F. Mesko, F. Goldschmidt, E.M. de Moraes Flores // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. – 2007. – Vol. 62. – No. 9. – P. 978-984.
139. Ponthieu, M. Speciation analysis of arsenic in landfill leachate / M. Ponthieu, P. Pinel-Raffaitin, I. Le Hecho, L. Mazeas, D. Amouroux // *Water research*. – 2007. – Vol. 41. – No. 14. – P. 3177-3185.
140. Tu, Q. Mercury speciation analysis in soil samples by ion chromatography, post-column cold vapor generation and inductively coupled plasma mass

- spectrometry / Q. Tu, W. Johnson Jr, B. Buckley // *Journal of analytical atomic spectrometry*. – 2003. – Vol. 18. – No. 7. 696-701.
141. Cattani, I. Characterization of mercury species in soils by HPLC–ICP-MS and measurement of fraction removed by diffusive gradient in thin films / I. Cattani, S. Spalla, G.M. Beone, A.A.M. Del Re, R. Boccelli // *Talanta*. – 2008. – Vol. 74. – No. 5. – P. 1520-1526.
142. Castillo, A. Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples / A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo // *Analytica chimica acta*. – 2006. – Vol. 577. – No. 1. – P. 18-25.
143. Cairns, W.R. Speciation analysis of mercury in seawater from the lagoon of Venice by on-line pre-concentration HPLC–ICP-MS / W.R. Cairns, M. Ranaldo, R.Hennebelle, C. Turetta, G. Capodaglio // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – Vol. 622. – No. 1-2. – P. 62-69.
144. de Souza, S.S. A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography–cold-vapor-inductively coupled plasma mass spectrometry / S.S. de Souza, A.D. Campiglia, F. Barbosa Jr, F. // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 761. – P. 11-17.
145. Chen, Z. Speciation of chromium in wastewater using ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry / Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu // *Talanta*. – 2007. – Vol. 72. – No. 2. – P. 394-400.
146. Zheng, J. Complexation effect of antimony compounds with citric acid and its application to the speciation of antimony (III) and antimony (V) using HPLC-ICP-MS / J. Zheng, A. Iijima, N. Furuta // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. – 2001. – Vol. 16. – No. 8. – P. 812-818.
147. Krachler, M. Speciation analysis of antimony by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry using ultrasonic

- nebulization / M. Krachler, H. Emons // *Analytica Chimica Acta*. – 2001. – Vol. 29. – No. 1. – P. 125-133.
148. Amereih, S. Speciation analysis of inorganic antimony in soil using HPLC-ID-ICP-MS / S. Amereih, T. Meisel, E. Kahr, W. Wegscheider // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2005. – Vol. 383. – P. 1052-1059.
149. Amereih, S. Antimony speciation in soil samples along two Austrian motorways by HPLC-ID-ICP-MS / S. Amereih, T. Meisel, R. Scholger, W. Wegscheider // *Journal of Environmental Monitoring*. – 2005. – Vol. 7. – No. 12. – P. 1200-1206.
150. Zhang, W. Fast speciation of iodide and iodate in edible salts and human urine by short column IC coupled with inductively coupled plasma MS / W. Zhang, X. Liu, X. Jia, Y. Han, X. Liu // *Chromatographia*. – 2010. – Vol. 72. – P. 1009-1012.
151. Michalke, B. Method developments for iodine speciation by reversed-phase liquid chromatography-ICP-mass spectrometry / B. Michalke, P. Schramel, H. Witte // *Biological trace element Research*. – 2000. – Vol. 78. – P. 67-79.
152. Reyes, L.H. Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry / L.H. Reyes, J.L.G. Mar, G.M. Rahman, B. Seybert, T. Fahrenholz // *Talanta*. – 2009. – Vol. 78. – No. 3. – P. 983-990.
153. Gammelgaard, B. Determination of trimethylselenonium ion in urine by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry detection / B. Gammelgaard, K.D. Jessen, F.H. Kristensen, O. Jøns // *Analytica chimica acta*. – 2000. – Vol. 404. – No. 1. – P. 47-54.
154. Juresa, D. Biological availability of selenosugars in rats / D. Juresa, M. Blanusa, K.A. Francesconi, N. Kienzl, D. Kuehnelt // *Chemico-biological interactions*. – 2007. – Vol. 168. – No. 3. – P. 203-210.

155. Chen, J.H. Determination of iodine and bromine compounds in foodstuffs by CE-inductively coupled plasma MS / J.H. Chen, K.E. Wang, S.J. Jiang // *Electrophoresis*. – 2007. – Vol. 28. – No. 22. – P. 4227-4232.
156. Liu, D. A study of bromine speciation in human serum and ambroxol determination in rat plasma by liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry / D. Liu, G. Chen, Z. Huo, H. Liu, W. Ji // *Chromatographia*. – 2019. – Vol. 82. – P. 927-934.
157. Bustos, A.R.M. The role of ICP-MS in separation science. – 2020. – P. 145-147.
158. Muller, A.L., Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS / A.L. Muller, P.A. Mello, M.F. Mesko, F.A. Duarte, V.L. Dressler // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. – 2012. – Vol. 27. – No. 11. – P. 1889-1894.
159. Chai, J.Y. Determination of bromine and iodine in twenty-three geochemical reference materials by ICP-MS / J.Y. Chai, Y. Muramatsu // *Geostandards and Geoanalytical Research*. – 2007. – Vol. 31. – No. 2. – P. 143-150.
160. Smith, B.R. Beyond C, H, O, and N! Analysis of the elemental composition of US FDA approved drug architectures: Miniperspective. / B.R. Smith, C.M. Eastman, J.T. Njardarson // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 57. – No. 23. – P. 9764-9773.
161. Balcaen, L.I. Hyphenation of reverse-phase HPLC and ICP-MS for metabolite profiling—application to a novel antituberculosis compound as a case study / L.I. Balcaen, B. De Samber, K. De Wolf, F. Cuyckens, F. Vanhaecke // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2007. – Vol. 389. – P. 777-786.
162. Meermann, B. Development of an oxygen-gradient system to overcome plasma instabilities during HPLC/ICP-MS measurements using gradient elution / B. Meermann, M. Kießhauer // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. – 2011. – Vol. 26. – No. 10. – P. 2069-2075.

163. Narukawa, T. Oxygenation mechanism of ions in dynamic reaction cell ICP-MS / Narukawa, T., & Chiba, K. (2013). // *Analytical Sciences*. – 2013. – Vol. 29. – No. 7. – P. 747-752.
164. Klencsár, B. High-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma–Mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) for quantitative metabolite profiling of non-metal drugs / B. Klencsár, L. Balcaen, F. Vanhaecke // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2018. – Vol. 104. – P. 118-134.
165. Cuyckens, F. Use of the bromine isotope ratio in HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS analysis of a new drug in development / F. Cuyckens, L.I. Balcaen, K. De Wolf, B. De Samber, C. Van Looveren // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2008. – Vol. 390. – P. 1717-1729.
166. Ul'yanovskii, N.V. Antiviral drug Umifenovir (Arbidol) in municipal wastewater during the COVID-19 pandemic: Estimated levels and transformation / N.V. Ul'yanovskii, D.S. Kosyakov, S.A. Sypalov, I.S. Varsegov, I.S. Shavrina // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 805. 150380.
167. Lebedev, A.T. GC–MS comparison of the behavior of chlorine and sodium hypochlorite towards organic compounds dissolved in water / A.T. Lebedev, G.M. Shaydullina, N.A. Sinikova, N.V. Harchevnikova // *Water Research*. – 2004. – Vol. 38. – No. 17. – P. 3713-3718.
168. Criquet, J. Reaction of bromine and chlorine with phenolic compounds and natural organic matter extracts–Electrophilic aromatic substitution and oxidation / J. riquet, E.M. Rodriguez, S. Allard, S. Wellauer, E. Salhi // *Water research*. – 2015. – Vol. 85. – P. 476-486.
169. Grbović, G. LC/MS study of the UV filter hexyl 2-[4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-benzoate (DHHB) aquatic chlorination with sodium hypochlorite / G. Grbović, P. Trebše, D. Dolenc, A.T. Lebedev, M. Sarakha // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2013. – Vol. 48. – No. 11. 1232-1240.
170. Detenchuk, E.A. Halogen substitution reactions of halobenzenes during water disinfection / E.A. Detenchuk, D.M. Mazur, T.B. Latkin, A.T. Lebedev // *Chemosphere*. – 2022. – Vol. 295. 133866.

171. Sypalov, S.A. Occurrence and Transformation of Antiviral Drug Umifenovir (Arbidol) in Municipal Wastewater / S.A. Sypalov, N.V. Ul'yanovskii, I.S. Varsegov, D.S. Kosyakov, A.T. Lebedev // Book of abstract 21st European Meeting on Environmental Chemistry. Serbia, Novi Sad. – 2021. – P. 105.
172. Wang, Y. Metabolite identification of arbidol in human urine by the study of CID fragmentation pathways using HPLC coupled with ion trap mass spectrometry / Y. Wang, X. Chen, Q. Li, D. Zhong // Journal of mass spectrometry. – 2008. – Vol. 43. – No. 8. – P. 1099-1109.
173. Sypalov, S.A. Mucolytic Drugs Ambroxol and Bromhexine: Transformation under Aqueous Chlorination Conditions // S.A. Sypalov, I.S. Varsegov, N.V. Ulyanovskii, A.T. Lebedev, D.S. Kosyakov // International Journal of Molecular Science. – 2024. – Vol. 25. – No. 10. 5214.
174. Huang, X. Bromate ion formation in dark chlorination and ultraviolet/chlorination processes for bromide-containing water / X. Huang, G.A.O. Naiyun, D. Yang // Journal of Environmental Sciences. – 2008. – Vol. 20. – No. 2. – P. 246-251.
175. Mazur, D.M. N-dealkylation of amines during water disinfection—Revealing a new direction in the formation of disinfection by-products / D.M. Mazur, A.S. Surmillo, S.A. Sypalov, I.S. Varsegov, N.V. Ul'yanovskii // Chemosphere. – 2024. – Vol. 350. 141117.
176. Wang, L. Aquatic photolysis of the pharmaceutical ambroxol: The role of 2, 4-dibromoaniline chromophore and heavy atom effect of bromine / L. Wang, H. Xu, J. Lu, J.M. Chovelon, Y. Ji // Water Research. – 2022. – Vol. 226. 119275.
177. Сыпалов, С.А. Идентификация побочных продуктов трансформации амброксола и бромгексина при процессах водного хлорирования / С.А. Сыпалов, И.С. Варсегов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // Тезисы докладов, представленных на IV Съезде аналитиков России. Москва. – 2022. – С. 261.
178. Сыпалов, С.А. Применение ВЭЖХ-МСВР и ВЭЖХ-ИСП-МС для скрининга умифеновира (Арбидола) и продуктов его трансформации /

- С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, И.С. Варсегов, Д.С. Косяков // В книге: «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» материалы VI Всероссийского симпозиума. Краснодар. – 2021. – С. 133.
179. Сыпалов, С.А. Определение умифеновира (Арбидола) и продуктов его трансформации в сточных водах г. Архангельска / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, И.С. Варсегов, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // В книге: «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» тезисы докладов IX Всероссийской конференции с международным участием. Москва. – 2021. – С. 41
180. Lyon, T.D.B. Determination of elevated concentrations of bromine in serum by ICP-MS and ICP-OES / T.D.B. Lyon, P.A. Robin, W.S. Watson, D. Littlejohn // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. – 2005. – Vol. 20. – No. 8. – P. 757-759.
181. Сыпалов, С.А. Новый подход к нецелевому скринингу бромсодержащих побочных продуктов дезинфекции в водопроводной воде / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // В книге: «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» тезисы докладов X Всероссийской конференции с международным участием. Москва. – 2023. – С. 65.
182. Сыпалов, С.А. Оптимизация условий извлечения амброксола и бромгексина из сточных вод и донных отложений для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // В книге: «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» тезисы докладов X Всероссийской конференции с международным участием. Москва. – 2023. – С. 66.
183. Сыпалов, С.А. Определение умифеновира и его метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с комбинированным масс-спектрометрическим детектированием / С.А. Сыпалов,

- Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // Журнал аналитической химии. – 2023. – Т. 78. – No. 9. – С. 856-864.
184. Sypalov, S.A. Determination of Umifenovir and Its Metabolites by High-Performance Liquid Chromatography with Combined Mass Spectrometric Detection / S.A. Sypalov, N.V. Ul'yanovskii, D.S. Kosyakov, A.T. Lebedev // Journal of Analytical Chemistry. – 2023. – Vol. 78. – No. 9. – P. 1191-1198.
185. Сыпалов, С.А. Определение лекарственных препаратов в отходах очистных сооружений канализации города / С.А. Сыпалов, Н.В. Ульяновский, Д.С. Косяков, А.Т. Лебедев // В книге: «Химия и технология растительных веществ» тезисы докладов XII Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых. Киров. – 2022. – С. 189